

**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE L'ÉLIMINATION URINAIRE
DES ŒSTROÏDES
AU COURS
DE LA GROSSESSE NORMALE**

THÈSE

PRÉSENTÉE

à la FACULTE de MÉDECINE et de PHARMACIE de LYON

et soutenue publiquement le 19 Juillet 1955

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Claude LEHUREAU

Née le 5 Mai 1924, à LUNÉVILLE (Meurthe-et-Moselle)



LYON

BOSC Frères

Imprimeurs-Éditeurs

42, quai Gailleton, 42

—
1955

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'ELIMINATION URINAIRE
DES GESTROIDES AU COURS DE LA GROSSESSE NORMALE

**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE L'ÉLIMINATION URINAIRE
DES ŒSTROÏDES
AU COURS
DE LA GROSSESSE NORMALE**

THÈSE

PRÉSENTÉE

à la FACULTE de MÉDECINE et de PHARMACIE de LYON

et soutenue publiquement le 19 Juillet 1955

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Claude LEHUREAU

Née le 5 Mai 1924, à LUNÉVILLE (Meurthe-et-Moselle)



LYON
BOSC Frères
Imprimeurs-Éditeurs
42, quai Gailleton, 42

1955

PERSONNEL DE LA FACULTE

Doyen M. HERMANN. | Doyen honoraire M. J. LEPINE.
Assesseur. M. J. GATE.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. NICOLAS, COLLET, CLUZET, BERARD, GUIART, PIERY, CADE, PATEL,
LEPINE, SAVY, TRILLAT, LERICHE, MOURIQUAND, MAZEL, LEULIER, GARIN.

PROFESSEURS

Clinique médicale A.	MM. FROMENT.
Clinique médicale B.	P. RAVAUT.
Clinique chirurgicale A.	SANTY.
Clinique chirurgicale B.	WERTHEIMER.
Clinique ophtalmologique.	BONNET.
Clinique urologique.	CIBERT.
Clinique et prophylaxie de la tuberculose.	DUFOURT.
Clinique dermatologique et syphiligraphique.	GATE.
Clinique neuro-psychiatrique et hygiène mentale.	DECHAUME.
Clinique des maladies infectieuses et bactériologie.	SEDALLIAN.
Clinique de chirurgie orthopédique et chirurgie infantile.	GUILLEMINET.
Clinique gynécologique.	POLLOSSON.
Clinique obstétricale.	PIGEAUD.
Clinique stomatologique.	DUCLOS.
Clinique médicale infantile et hygiène du premier âge.	BERNHHEIM.
Clinique oto-rhino-laryngologique.	MAYOUX.
Physiologie.	HERMANN.
Anatomie pathologique.	J.-F. MARTIN.
Physique biologique, radiologie et physiothérapie.	PONTHUS.
	(détaché à Beyrouth)
Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire.	ROCHET.
Chimie organique et toxicologie.	CHAMBON.
Pathologie générale et expérimentale.	JOSSERAND.
Hydrologie thérapeutique, climatologie et écologie sociale.	DELORE.
Anatomie.	GABRIELLE.
Pathologie interne.	CROIZAT.
Chimie biologique et médicale.	ENSELME.
Pathologie chirurgicale.	MALLET-GUY.
Histologie.	NOEL.
Pharmacie galénique et matière médicale.	REVOL.
Médecine du travail.	BOURRET.
Thérapeutique.	LEVRAT.
Hygiène et action sanitaire et sociale.	CIER André.
Biologie médicale et pharmacodynamie.	SOHIER.
Botanique et cryptogamie.	JOURDAN.
Propédeutique chirurgicale.	NETIEN.
Chimie analytique pharmaceutique.	BERTRAND.
Pharmacie et pharmacologie.	BADINAND.
Médecine légale et déontologie.	RECHON.
Parasitologie et pathologie exotique.	ROCHE.
	X..



PROFESSEURS TITULAIRES SANS CHAIRE

Obstétrique. M. BANSSILLON. | Physique biologique M. BERGER.

MAITRES DE CONFERENCES - AGREGES

Parasitologie. MM. ROMAN.	Pharmacie galénique
Parasitologie. COUDERT.	et matière médicale. MM. DORCHE.
Physiologie. CIER J.-F.	Anatomie. DUROUX.
Physiologie. CHATONNET	Pharmacie et Pharmacologie
Chimie biologique	Hygiène. BENAZET.
et médicale CREYSEL R.	Anatomie pathologique FEROLDI.
Bactériologie. BERTOYE A.	Chimie organique
	et Toxicologie PERROT L.

AGREGES EN EXERCICE

Pathologie médicale . MM. GALY.	Ophtalmologie. MM. PAUFIQUE.
Pathologie médicale GONIN.	Obstétrique. MAGNI N.
Pathologie médicale GUINET.	Obstétrique. MATHIEU J.
Pathologie médicale PONT.	Obstétrique. BURTHIAULT.
Pathologie médicale VIGNON.	Oto-rhino-Laryngologie. GIGNOUX.
Pathologie médicale REVOL.	Dermato-Vénérologie THIERS.
Pathologie médicale TRAEGER.	Urologie PERRIN.
Pathologie chirurgicale	Neuro-Chirurgie. LECUIRE.
Pathologie chirurgicale	Orthopédie MARION Joseph.
Pathologie chirurgicale	Stomatologie FREIDEL.
Pathologie chirurgicale	Electro-Radiologie PAPILLON.
Pathologie chirurgicale	Pédiatrie et Puériculture. FRANÇOIS.
Pathologie chirurgicale	Thérapeutique BRETTE.
	Maladies infectieuses. MONNET.
Pathologie chirurgicale	SAUTOT.

CHARGE DES FONCTIONS D'AGREGE

Médecine légale. M. COLIN.

CHARGES DES FONCTIONS DE MAITRE DE CONFERENCES - AGREGE

Histologie. M. DUMONT Louis. | Physique biologique. M. MORET.

LES EXAMINATEURS DE LA THESE :

Président : M. PIGEAUD ; Assesseurs : MM. BANSSILLON, BROCHIER et MATHIEU

La Faculté de Médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner ni approbation, ni improbation.

A MON MARI

ET A MES FILS

A MES PARENTS

Qu'ils trouvent ici l'expression de ma
plus profonde affection.

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE :
MONSIEUR LE PROFESSEUR HENRI PIGEAUD
Professeur de Clinique Obstétricale

En témoignage de notre respectueuse
gratitude.

Nous remercions :

MONSIEUR LE PROFESSEUR BANSSILLON

Accoucheur des Hôpitaux

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ BROCHIER

Accoucheur des Hôpitaux

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ MATHIEU

Chirurgien des Hôpitaux

D'avoir bien voulu faire partie du jury
de notre thèse.

INTRODUCTION

Nous avons été vivement intéressés lors de notre stage à la clinique obstétricale qu'il dirige, par l'enseignement de M. le Professeur Pigeaud. Nous y avons pris connaissance des acquisitions les plus récentes de la physiologie obstétricale ainsi que des progrès considérables effectués ces dernières années dans ce domaine.

Etant donné notre formation antérieure, et l'intérêt que nous avons toujours porté, au cours de nos études médicales, à l'aspect scientifique et plus particulièrement chimique des problèmes posés aux cliniciens, M. le Professeur Pigeaud a bien voulu nous proposer un sujet de thèse dans le domaine de l'endocrinologie gravidique ; qu'il nous permette ici de lui en exprimer notre profonde reconnaissance.

M. le Professeur Agrégé Burthiault, ancien chef de laboratoire à la clinique obstétricale, nous a fixé le sujet de cette thèse, troisième et dernière terminant un cycle d'études sur l'excrétion hormonale au cours de la grossesse normale. Les deux thèses précédentes présentées par le Docteur Charre et le Docteur Charrière traitaient de l'excrétion du Prénandiol et de l'excrétion des corticoïdes, cette importante étude devant servir de base à l'étude des troubles hormonaux dans les principaux syndromes pathologiques de la gestation.

Nous savons l'importance attachée par le Docteur Burthiault à de telles études et nous le remercions vivement de la confiance qu'il nous a faite en nous proposant d'y contribuer.

M. Bethoux, pharmacien-biologiste qui a mis au point la technique actuellement utilisée dans les dosages effectués chaque jour au laboratoire, a bien voulu diriger la partie technique de notre exposé, qu'il trouve ici l'expression de notre gratitude.

CHAPITRE I

GENERALITES SUR LES HORMONES ŒSTROGENES

I. — Découverte

Dès 1927, Zondeck et Ascheim avaient mis en évidence le pouvoir œstrogène très élevé des urines de la femme enceinte.

La Folliculine, actuellement dénommée *œstrone* fut la première hormone isolée de l'urine en 1929 par Doisy et Butenandt. Ce dernier en détermina la structure chimique. Marrian en 1930 isole de même un composé voisin le « corps de Marrian » actuellement dénommé *œstriol*. Celui-ci présent en quantité considérable dans l'urine de femme enceinte a un pouvoir œstrogène très inférieur à celui de l'œstrone. Mais Schwenk et Hildebrand en 1933 obtenaient par réduction de l'œstrone une hormone à haut pouvoir œstrogène qui semblait être la véritable hormone folliculaire. Mac Corquodale, Thayer et Doisy (1935) l'ont isolé des ovaires de truie et Smith et ses Collaborateurs (1939) de l'urine de femme enceinte. C'est l'œstradiol.

II. — Propriétés.

Ce sont des corps actuellement bien définis chimiquement, ils se rattachent au groupe des stéroïdes sexuels.

1° PROPRIÉTÉS PHYSIQUES :

—Nous ne retiendrons de celles-ci que les propriétés permettant l'extraction ou la caractérisation des hormones dans l'urine.

Solubilité. --- Les trois hormones sont très peu solubles dans l'eau. Dans les solvants organiques les solubilités de l'œstradiol sont très peu différentes des solubilités de l'œstrone. L'œstriol par contre se distingue nettement de ces dernières.

L'œstrone et l'œstradiol sont très solubles dans : l'alcool, le chloroforme, le benzène, l'acétone, l'acétate d'éthyle, l'éther et la pyridine, peu soluble dans l'éther de pétrole.

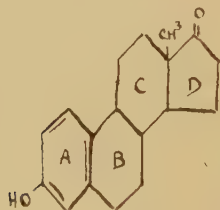
L'œstriol est très soluble dans : l'éther, le benzène et le chloroforme et surtout très peu soluble dans l'éther de pétrole.

Spectres d'absorption. — Absorption dans l'U.V. Celle-ci présente pour chacun des trois œstrogènes une bande d'absorption vers 2820 Å (1) en solution neutre ou acide. Cette bande se déplace vers 2950 Å par alcalinisation de la solution par formation d'un sel phénolique.

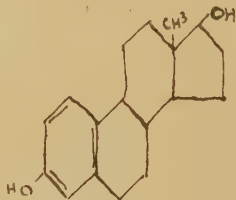
Absorption dans l'I.R. Le domaine d'absorption de stéroïdes est compris entre 9350 Å et 9450 Å.

2° PROPRIÉTÉS CHIMIQUES :

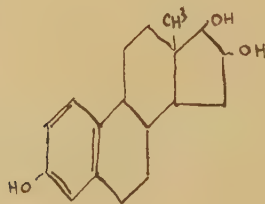
Formules chimiques.



Oestrone



α oestradiol



oestriol

(1) Å = Angstrom.

Fonction phénolique. — Elle appartient aux trois œstrogènes et elle explique un certain nombre de leurs propriétés en particulier leur solubilité dans les alcalis. A noter, que la fonction phénolique de l'œstriol est « activée » par deux fonctions alcooliques sur le cycle D en 16 et 17. Ce caractère phénolique fort permet divers procédés de séparation de l'œstriol des deux autres œstrogènes. Sa solubilité dans les alcalis étant supérieure à la solubilité de ceux-ci.

Autres fonctions. — L'œstrone présente en C 17 une fonction cétone, fonction qui permet la séparation de l'œstrone par action d'un réactif général des cétones tel que le réactif T de Girard (Chlorure de triméthylacéthydrazide ammonium). Il se forme un complexe hydrosoluble mais insoluble dans les solvants organiques, l'œstrone est régénéré très simplement par hydrolyse acide.

L'œstradiol présente en 17 à la place de la fonction cétone une fonction alcool secondaire d'où son nom de dihydrofolliculine. L'hydrogénation de $C=O$ en 17 fait apparaître un carbone asymétrique d'où deux isomères :

α 17 œstradiol

β 17 œstradiol

L' α -œstradiol serait l'hormone folliculaire vraie que l'on trouve dans l'urine de femme enceinte, néanmoins la forme β -œstradiol a été isolée de l'urine de jument gravide par Hirschmann et Wintersteiner en 1938.

L'œstriol en 16 et 17 présente deux fonctions alcool secondaires voisines, par déshydratation de celles-ci, en présence de bisulfate de potassium à chaud, on obtient l'œstrone d'où son nom d'hydrate de folliculine. Les relations entre ce composé et la folliculine sont celles qui existent entre un α glycol et la cétone qui en résulte par déshydratation.

III. — Métabolisme.

1° ORIGINE DES ŒSTROGÈNES :

Marrian a proposé un schéma hypothétique de la genèse de l'œstrone et de l'œstradiol à partir du cholestérol en passant

par les stades déhydroandrostérone, androstènedione et testostérone. Bloch (1944) a donné la preuve de la filiation synthétique de la progestérone à partir du cholestérol par l'injection à une femme enceinte d'un deuterocholestérol (H marqué), identifiable dans l'urine sous forme de Deutero-prégnandiol. Mais une telle démonstration n'a pu être donnée pour les œstrogènes. On ignore tout des étapes intermédiaires qui relient les hormones stéroïdes au cholestérol.

Au niveau de l'ovaire, c'est le follicule de De Graaf qui est le siège histologique de la formation de l'hormone folliculaire. Il comporte une cavité centrale remplie de liquide folliculaire qui baigne l'ovocyte inclus dans la granulosa et qu'entoure la thèque interne. Pour Ascheim et Zondeck la thèque interne est le siège de la formation de l'œstradiol, pour Allen en 1941, la biogénèse de l'œstradiol aurait pour siège la granulosa. Celle-ci ne présentant aucune structure endocrine, il paraît plus logique de revenir à la conception d'Ascheim et Zondeck.

Au moment de la formation du corps jaune, celui-ci continue à sécréter en même temps progestérone et hormones folliculaires. L'ablation de l'ovaire à partir du 6^e mois de la grossesse n'interrompt pas la gestation et l'élaboration d'œtrogène. On admet que ceux-ci sont alors sécrétés par le placenta. Le lieu de leur formation serait les cellules syncytiales des villosités choriales.

2° MÉTABOLISME INTERMÉDIAIRE :

Les hormones folliculaire et luteale subissent deux métabolismes bien distincts.

Le premier, s'effectuant au niveau des récepteurs, représente le métabolisme d'utilisation fonctionnel, le second a lieu au niveau du foie où les hormones sont traitées comme des substances toxiques et soumises à un métabolisme de détoxication.

Métabolisme d'utilisation fonctionnelle.

Jayle résume le métabolisme dans l'équation suivante :

œstrone + progestérone + hydrate de carbone $\rightarrow$ +œstriol + prégnandiol + glycogène

Cette équation explique la formation du glycogène endométrale au cours de l'activité du corps jaune et la participation nécessaire des deux hormones folliculinique et lutéale.

La signification biologique des trois hormones œstrogènes est la suivante :

L' α œstradiol est bien l'hormone folliculaire vraie, mais il est abusif de considérer l'œstrone comme un produit du métabolisme de celle-ci. Il existe en réalité un système d'oxydo-réduction en équilibre :



L'œstriol, par contre, a une tout autre signification biologique. Elle est le résultat du métabolisme fonctionnel des deux autres hormones.

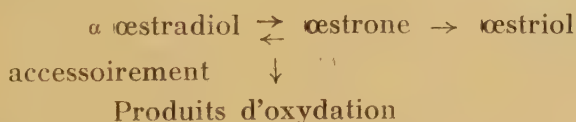
Pincus et Zahl, en 1937, ont montré chez le Lapin comment l'apparition de l'œstriol après injection d'œstrone ou d' α œstradiol dépendait de la présence d'un corps jaune fonctionnel ou d'un placenta.

Smith et Smith, en 1940, ont appliqué ces données chez la femme. Ils expriment l'apparition de l'œstriol par l'équation irréversible suivante : œstrone + H_2O $\rightarrow$ œstriol.

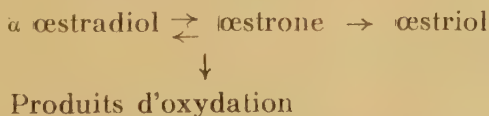
Cette réaction irréversible est facilitée par l'action de la progestérone. Celle-ci est aussi considérée comme protectrice de la destruction oxydative de la folliculine.

Donc pour ces auteurs :

en présence de progestérone les phénomènes se passent selon le schéma suivant :



en l'absence de progestérone



Bien que cette théorie de Smith et Smith soit encore actuellement admise, nous signalerons les travaux de Pearlman et

Rakoff en 1953 ; ces auteurs utilisent l'œstrone marqué au deutérium qu'ils injectent à deux femmes dans le dernier trimestre de la gestation et recueillant les urines, calculent le pourcentage de l'hormone injectée retrouvée sous forme d'œstriol. Ils comparent ces résultats avec ceux que l'on peut obtenir chez l'homme. Bien que, dans le premier cas, la quantité de progestérone présente dans l'organisme soit considérable, et bien que chez l'homme cette hormone soit absente, la proportion d'hormone marquée excrétée dans l'urine sous forme d'œstriol est très voisine dans les deux cas et de l'ordre de 6 à 7 %.

Stimmel et Stealey (1952) ont de même montré que la progestérone vraisemblablement n'influencerait pas le métabolisme des œstrogènes pendant le cycle menstruel.

Métabolisme de détoxication.

Il nous est impossible ici de donner et de discuter les très nombreuses expériences *in vivo* et *in vitro* que ce sujet a suscité. Nous nous limiterons à schématiser quelques résultats admis par tous les auteurs.

Le siège de la destruction oxydative des œstrogènes serait le foie. Heller (1940) apporte la preuve expérimentale que les coupes de foie inactivent rapidement *in vitro* l'œstrone et l'œstradiol et que cette inactivation est liée à la respiration de l'organe. Ils ont même démontré la nature enzymatique de cette inactivation et la nature ferrugineuse du système enzymatique (technique des inhibiteurs). Les coupes de reins ont une activité enzymatique du même ordre, mais très faible. Tout autre tissu est incapable d'inactiver la folliculine.

La nature des produits résultant de la destruction oxydative des œstrogènes est encore inconnue. Smith et Smith (1944) ont émis l'hypothèse que ces produits, auraient la propriété de stimuler l'hypophyse, provoquant une décharge de gonadotrophines qui, à leur tour, agissent sur l'ovaire, déclenchant la maturation d'un nouveau follicule. Mais nous avons vu que selon Smith et Smith, la progestérone empêchait cette destruction oxydative, ainsi pendant la grossesse, grâce à la progestérone, le muscle utérin utilise les quantités d'œstrogène mises à sa disposition et les transforme en œstriol que l'on retrouve dans l'urine en quantité considérable.

Excrétion urinaire.

Schématiquement on retrouve dans l'urine :

- Un corps résultant du métabolisme d'utilisation : l'œstriol.
- Des corps résultant du catabolisme ou destruction oxydative.
- Des œstrogènes non utilisés et non détruits (œstrone, α œtradiol).

Si on ne connaît pas la nature exacte et la forme sous laquelle sont excrétés les produits du catabolisme des œstrogènes, de nombreux travaux, par contre, ont mis en évidence la nature d'excrétion des œstrogènes non utilisés et de l'œstriol.

Ceux-ci étant insolubles dans l'eau, doivent subir une transformation hépatique, celle-ci consiste en une conjugaison avec l'acide glycuronique ou l'acide sulfurique. L'œstriol et l' α œtradiol sont ainsi convertis en glycuronides, mais l'œstrone, grâce à sa fonction cétone en 17, s'élimine aussi sous forme sulfo-conjuguée.

Le rapport selon lequel s'éliminent ces divers produits varie pendant le cycle et au cours de la grossesse. Jayle, dosant sous le nom de « phénolstéroïdes totaux » les produits du métabolisme des œstrogènes conjointement avec les œstrogènes eux-mêmes, sous le nom de « folliculine » les trois œstrogènes seulement, a montré que pendant le cycle, ces phénostéroïdes totaux peuvent être excrétés à des taux 10 à 20 fois supérieurs au taux d'excrétion de la « folliculine » (œstrone, œtradiol, œstriol), pendant la grossesse, dès le 3^e mois, le taux des « phénolstéroïdes totaux » est très voisin du taux de la folliculine. Dans ce cas la « folliculine » de Jayle contient une proportion très importante d'œstriol.

Il résulte de cette observation que le métabolisme d'utilisation des œstrogènes prend une place prépondérante par rapport au métabolisme de détoxication pendant la grossesse.

(*)
**

Au terme de ce chapitre, qui n'est qu'un exposé très incomplet de quelques propriétés et de quelques notions encore à l'étude du métabolisme des œstrogènes, nous voulons souligner la

complexité de ce problème et quelles difficultés il entraîne dans l'appréciation du taux des hormones excrétées dans les urines. Toutes les techniques de dosage proposées dosent tout ou partie des produits ci-dessus énumérés. Dans la plupart des cas, les auteurs sont d'ailleurs incapables de déterminer exactement la nature des produits qui interviennent dans la réaction mise en jeu pour le dosage. Si certaines méthodes modernes, telle la chromatographie, permettent de doser des corps chimiquement définis (œstrone, œstradiol, œstriol), elle ne rendent pas compte d'une fraction importante du métabolisme représentée par des produits de destruction ou des produits incomplètement métabolisés.

Mais si des techniques différentes donnent déjà des résultats de dosage difficilement comparables entre eux, il faut toujours tenir compte de troubles possibles intervenant dans la sécrétion et l'excrétion urinaire et c'est ainsi que des troubles hépatiques sévères ou des modifications de la perméabilité rénale peuvent modifier les résultats. De plus, en dehors de toute anomalie pathologique, on rencontrera des variations individuelles ou journalières de l'élimination hormonale.

CHAPITRE II

METHODES DE DOSAGE DES ŒSTROGENES URINAIRES

Nous ne décrirons pas ici dans tous leurs détails techniques les différentes méthodes de dosage. Celles-ci sont innombrables et aucune ne donne encore entière satisfaction. Nous nous limiterons à signaler les divers tests biologiques qui ont été et sont encore parfois utilisés pour le dosage chimique de l'hormone.

Les méthodes colorimétriques sont presque universellement adoptées par les laboratoires qui ont à doser les œstrogènes dans des urines présentant une concentration de l'ordre du milligramme. La méthode s'adapte donc très bien aux urines de femme enceinte à partir du 3^e ou 4^e mois de la grossesse:

Les méthodes fluorimétriques sont incontestablement séduisantes par leur grande sensibilité. Elles permettraient de doser de très faibles quantités d'hormones (de l'ordre de 50 γ) et seraient utilisables pour suivre l'excrétion hormonale pendant le cycle ou au début de la grossesse. Mais malheureusement les impuretés des extraits urinaires ont une influence très nette sur la fluorescence et font perdre à la méthode beaucoup de son intérêt.

Les méthodes modernes utilisant les propriétés physico-chimiques des œstrogènes :

- absorption dans l'ultra-violet,
- absorption dans l'infra-rouge,
- propriétés polarographiques,
- séparation par chromatographie d'absorption ou chromatographie de partage,

sont en pleine évolution. Les conditions techniques des dosages ne sont pas encore établies. Ce sont des méthodes d'avenir, d'un intérêt certain. Etant donné la multiplicité des techniques proposées, nous nous limiterons à signaler les grands principes de ces méthodes.

Le premier temps de toutes les techniques de dosage sera le même. Il a pour but de préparer un extrait contenant les œstrogènes suffisamment purs et à l'état libre. Les techniques biologiques ne nécessitent qu'une purification sommaire. Les méthodes colorimétriques, dont la réaction de Kober, sont sensibles aux impuretés et la purification doit être déjà très poussée, mais ce sont les techniques fluorimétriques et plus encore les méthodes modernes qui dépendent étroitement, étant donné leur haute sensibilité, de la pureté de l'extrait.

La préparation de l'extrait urinaire constituera le premier paragraphe de ce chapitre.

EXTRACTION — PURIFICATION

SEPARATION DES ŒSTROGENES

L'extraction des œstrogènes de l'urine de femme enceinte en vue de leur dosage chimique comprend divers temps :

— Libérer les œstrogènes de leur combinaison avec les acides glycuronique ou sulfurique.

— Extraire les œstrogènes libérés et les œstrogènes libres de l'urine par un solvant organique approprié, le coefficient de partage intervenant en sa faveur.

— La solution brute d'œstrogène ainsi obtenu doit être lavée et traitée par des solutions alcalines en vue d'éliminer les impuretés dissoutes pendant le deuxième temps et en particulier certains phénols et aussi de séparer les œstrogènes en deux fractions dont la solubilité dans les solvants organiques est si différente que la purification n'est possible que par fraction isolée :

- a) fraction phénolique forte contenant l'œstriol ;
- b) fraction phénolique faible contenant œstrone et œstradiol.

I. — L'hydrolyse des œstrogènes conjugués.

A. — MISE EN ÉVIDENCE DE L'EXISTENCE DE CES ŒSTROGÈNES CONJUGUÉS :

Ce n'est que récemment que l'on émit l'hypothèse de l'existence d'esters glycuronique et sulfurique des œstrogènes dans l'urine de femme enceinte. Pourtant, on connaissait dans l'urine de jument gravide l'existence de sulfate d'œstrone, mais on n'avait pu isoler cet ester de l'urine de femme enceinte, étant donné les quantités extrêmement faibles contenues dans l'urine de femme.

Zondeck et Ascheim, dès 1928, acidifiaient les urines par l'acide acétique avant extraction à l'éther, mais n'avaient pas en vue dans cette opération une hydrolyse impossible dans ces conditions.

Zondeck, en 1930, eut l'idée d'exécuter un prétraitement plus énergique sur les urines de jument gravide. Il montra qu'une partie des œstrogènes n'est pas extractible par le chloroforme avant ce traitement. Mais ce même auteur, en 1934, soutenait encore que le traitement acide n'est pas nécessaire pour les urines de femme.

Collip, Brown et Thomson, en 1932, mentionnent que les urines de femme enceinte contiennent des œstrogènes insolubles dans l'éther semblables à ceux que l'on extrait du placenta humain.

Lipschutz et Poch (1932) montrent que le rendement en œstrogène est maximum si l'on fait bouillir l'urine pendant 15 minutes avec HCl concentré à 10 ou 20 %.

Marrian (1933) acidifiait avec SO_3H_2 avant épuisement à l'éther.

Borchard, Dinquemaue et Laqueur (1934) cherchent les conditions d'hydrolyse les meilleures, acidifiant par HCl jusqu'à pH 3, puis additionnant HCl à la concentration de 3,6 %.

Mais c'est Cohen et Marrian (1935) qui donnent une méthode, encore actuellement utilisée par certains auteurs : hydrolyse 2 heures à l'autoclave d'un mélange devant avoir un pH final égal à 1 ; pour cela ils ajustent le pH de 100 cc. d'urine à pH = 1, puis additionnent 3,3 cc. d'acide chlorhydrique concentré (12 N).

B. — LES PRINCIPALES TECHNIQUES D'HYDROLYSE :

a) *Hydrolyse alcaline :*

Elle n'est pas à retenir, Cohen et Marrian (1935) ont montré que la destruction des œstrogènes était très importante par cette méthode.

b) *Hydrolyse acide :*

Elle est presque universellement adoptée dans les laboratoires de pratique courante, elle n'est pourtant pas rigoureusement au point dans la détermination des conditions optima de libération des œstrogènes avec destruction minimum de ceux-ci ; elle a fait éclore de nombreux travaux.

c) *Hydrolyse enzymatique :*

C'est une méthode moderne plus spécialement utilisée dans les laboratoires de recherche (étude du métabolisme par exemple), elle est très sélective, mais son utilisation courante dépend des progrès dans la préparation des enzymes et de leur pureté. Elle présentera toujours le très gros inconvénient de la nécessité d'une longue incubation (3 jours).

ETUDE DES TECHNIQUES D'HYDROLYSE ACIDE

En fait, deux techniques originales.

Celle de Cohen et Marrian (1935) utilisant l'autoclave, une hydrolyse prolongée et une acidité faible, s'oppose à la méthode qu'utilisent Smith et Smith : HCl 15 %, 10 mn à reflux.

De nombreux auteurs utilisent successivement l'une et l'autre méthode, ainsi Stimmel (janvier 1946) propose une hydrolyse de 3 heures à 120° et dans une publication ultérieure (septembre 1946) une hydrolyse de 1 heure à 100°, ce qui démontre la difficulté de prendre parti pour l'une ou l'autre méthode.

En réalité, une hydrolyse prolongée entraîne inéluctablement une destruction d'œstrogène, une hydrolyse à la pression ordinaire à l'ébullition pendant un temps court et souvent insuffisante. De plus, il semble qu'il y ait une certaine variabilité dans la rapidité de l'hydrolyse suivant les échantillons urinaires.

Cohen et Marrian ont étudié la perte des œstrogènes extractibles par l'éther, en prolongeant le chauffage en présence d'acide. Ils constatent que cette perte est d'autant plus importante que de l'oxygène est introduit dans le milieu et ils concluent à une destruction oxydante.

Falk et Heard (1949) étudient le rendement en œstrogène lors de l'hydrolyse des œstrogènes conjugués. Ce rendement est augmenté considérablement en milieu non oxydant (atmosphère d'azote) ou même réducteur (HCl en présence de Zn).

Van Bruggen (1948) prétend qu'il y a inactivation des solutions d'œstrone, œstradiol et œstriol par chauffage prolongé avec HCl. Cette inactivation peut être protégée par la présence d'acide 1 amino, 2 naphthol sulfonique ou, en travaillant en atmosphère d'azote. Mais de telles précautions ne donnent aucune augmentation de rendement de l'hydrolyse dans le cas de l'urine.

C'est Rosenmund (1948) qui donne l'explication possible de ce phénomène par la présence d'un inhibiteur d'oxydation dans l'urine. Celui-ci se trouve en quantité variable avec les urines. La destruction oxydante des œstrogènes est donc elle-même variable et explique les résultats divergents obtenus par Falk et Heard et Van Bruggen.

Rosenmund utilise comme protecteur d'oxydation pendant l'hydrolyse l'acide ascorbique, le pyrogallol ou le chlorure ferreux.

Smith et Smith, dès 1937, signalaient eux aussi que l'addition de zinc augmentait considérablement le rendement en œstrogène. Ils opéraient alors leur dosage par voie biologique. Partant de cette observation, les auteurs émirent l'hypothèse selon laquelle un milieu réducteur exercerait non seulement une action inhibitrice sur des réactions de destruction, mais aussi rendrait leur qualité biologique d'œstrogène à des produits du catabolisme de ceux-ci. Cette théorie portait loin, puisque, pour ces auteurs, ces produits hypothétiques auraient un rôle dans le contrôle de l'activité gonadotrophique du lobe antérieur de l'hypophyse et dans le maintien de la sécrétion de la progestérone sur le corps jaune et le placenta (Smith et Smith, 1940, Smith et Smith et Schiller, 1941).

Smith et Smith (1941) admettaient bien qu'une partie de cette augmentation en œstrogène pouvait être due à la transfor-

mation de l'œstrone en α -œstradiol, qui a une action biologique plus intense. Mais ils établissent un rapport entre l'hydrolyse en présence de zinc (TZn) pendant 3 heures à l'ébullition et l'hydrolyse ordinaire pendant 10 minutes à 100° selon leur technique initiale (To). Ce rapport TZn/To passe par des maxima au cours du cycle menstruel et pendant la grossesse et ils ont démontré qu'alors le taux d'œstrogène correspondant était très faible.

D'autres auteurs, Stimmel (1949) en particulier, reprenant les travaux des Smith et utilisant la réaction de Kober, retrouvent les mêmes résultats. Stimmel émet l'hypothèse de la présence d'une ceto-16-œstrone qui, par action de $\text{HCl} + \text{Zn}$, donne un chromogène pour la réaction de Kober.

Stevenson et Marrian et plus tard Marrian et Bauld font la critique très justifiée à Smith et Smith d'établir un rapport TZn/To dans des conditions de temps d'hydrolyse très différentes. Pendant les dix minutes que dure l'hydrolyse dans les conditions ordinaires, il est fort possible que celle-ci ne soit pas complète, alors que l'hydrolyse en présence de zinc dure trois heures. Stevenson et Marrian ont cherché à établir ce rapport dans les mêmes conditions de temps (60 mn d'hydrolyse avec 15 % d'HCl). Ils ont obtenu un accroissement dans le cas de l'hydrolyse chlorhydrozincique qui n'est que de 30 %. Ce qui peut fort bien s'expliquer par la protection que le milieu réducteur exerce sur les œstrogènes libérés.

La question n'est actuellement pas tranchée et de nombreux auteurs se contentent d'une hydrolyse à reflux en atmosphère inerte après avoir chassé tout l'oxygène du milieu par passage d'un courant d'azote. Ceci semble une solution de prudence. Le milieu chlorhydrozincique, par son hydrogène naissant, est trop violemment réducteur et il est regrettable que des protecteurs d'oxydation doux telles que les molécules organiques utilisées par Van Bruggen et Rosenmund, cités précédemment, n'aient pas été plus largement expérimentées.

ETUDE DES TECHNIQUES D'HYDROLYSE ENZYMATIQUE

Dès 1933, Marrian avait constaté que l'abandon des urines pendant plusieurs jours sans protection entraînait le développement d'une flore bactérienne et une augmentation de la dose d'œstrogène biologiquement active.

Cohen et Marrian (1934) utilisent *B. Coli* et obtiennent une hydrolyse comparable à l'hydrolyse chlorhydrique.

Cohen, Marrian et Odell (1936) ont isolé de l'urine de femme enceinte un glycuronate d'œstriol. L'agent enzymatique responsable semblait donc être la glycuronidase.

Odell, Skill et Marrian (1937) montrent que l'intestin de souris contient une enzyme capable d'hydrolyser le glycuronate d'œstriol pur.

Fischmann isole à son tour une enzyme de la rate de bœuf.

Jayle (1943) utilise l'*Aspergillus Niger* et la glycuronidase splénique testée en unité Fischmann. Jayle trouve cette hydrolyse insuffisante (rendement inférieur à 80 %), trop lente et donnant des produits de décomposition, pigments conduisant à des émulsions.

Cohen et Bates (1949) mettent en évidence l'existence de sulfate d'œstrogène et montrent qu'aussi bien l'œstradiol et l'œstriol que l'œstrone peuvent être excrétés sous cette forme. Ils utilisent l'*Aspergillus Orizae*, contenant la mylase P, ayant une action enzymatique de phénolsulfatase et non de glycuronidase.

Grant et Marrian (1950) ont utilisé la β -glycuronidase de rate de bœuf pour hydrolyser le glycuronate d'œstriol et ont montré que l'acide glycuronique était dextrogyre.

Il ressort de ces quelques travaux que la méthode d'hydrolyse enzymatique, très séduisante par son action sélective, donne une plus grande pureté aux solutions obtenues, une moindre destruction d'œstrogène et un extrait moins coloré. Mais cette méthode n'est encore utilisable que pour le laboratoire de recherches et la technique de son utilisation pour les dosages en série n'a pas encore été mise au point. Ceci est en grande partie dû à la difficulté pratique de se procurer les enzymes nécessaires. Il semble cependant, d'après les travaux de Henry, Thévenet et Jarrige, que l'utilisation du suc d'*Helix pomatia* permette à cette méthode d'entrer dans la pratique courante.

II. — L'extraction des œstrogènes.

L'extraction des œstrogènes consiste à mettre en présence de l'urine un solvant organique. Les œstrogènes passent alors de

la phase urinaire à la phase organique dans une proportion définie par le coefficient de partage. L'extraction est d'autant plus facile que celui-ci est plus élevé en faveur du solvant organique. Le nombre d'opérations nécessaire est d'autant moins élevé ; mais une extraction continue peut être effectuée lorsqu'il est nécessaire d'utiliser un solvant à bas coefficient de partage pour l'œstrogène considéré.

a) CHOIX DU SOLVANT :

Une bonne extraction dépendra donc des conditions suivantes :

— Un solvant approprié, les coefficients de partage étant satisfaisants pour chacun des trois œstrogènes.

— Les deux phases solvant-urine, facilement séparables, aucune émulsion à l'inter-phase.

— Pas de solubilité partielle du solvant dans l'urine.

Bachman et Pettit (1941) ont étudié les coefficients de partage des trois œstrogènes pour un certain nombre de systèmes urine-solvant organique. Ils ont tracé des tableaux de ces résultats. Ils concluent qu'il existe en principe seulement deux solvants d'extraction convenables : l'éther et le benzène.

Le benzène est un excellent solvant pour l'œstrone et l'œstradiol, mais un médiocre solvant de l'œstriol. Il nécessite une quantité importante de C_6H_6 ou une extraction continue.

L'éther est un solvant convenable des trois œstrogènes, mais extrait aussi de l'urine de nombreuses impuretés chromogènes. Il donne parfois des émulsions gênantes entre les deux phases.

Bachman et Pettit ont constaté que le coefficient de partage variait pour un même solvant avec les échantillons urinaires. Il est possible de rendre favorable l'extraction de l'œstriol par le benzène en saturant l'urine de chlorure de sodium.

A cause de la solubilité très différente des trois œstrogènes, il ne leur semble pas possible de purifier les œstrogènes par distribution sans les séparer en deux fractions.

— Une fraction dite fraction O D, contenant l'œstrone et l'œstradiol. Cette fraction est encore appelée phénolique faible.

— Une fraction dite fraction T, contenant l'œstriol, dite encore fraction phénolique forte, étant donné sa forte réaction vis-à-vis des bases.

Bachman et Pettit ne cherchent pas à séparer l'œstrone de l'œstradiol, ce dernier étant en très faible proportion dans les urines de femme enceinte.

b) TECHNIQUE GÉNÉRALE D'EXTRACTION ET DE SÉPARATION :

Nous décrirons deux grands types de méthode que les divers auteurs ont plus ou moins modifiés ou adaptés à des problèmes de séparation plus complète.

— *Méthode de Cohen et Marrian (1934).*

Les urines ayant subi une hydrolyse chlorhydrique de 2 heures à l'autoclave, sont mises en présence d'éther. La phase étherée ayant extrait les 3 œstrogènes est séparée de la phase urinaire rejetée. La phase étherée est lavée avec une solution de carbonate de soude, puis elle est mise en présence d'une solution de soude N/10. La solution alcaline séparée de la phase étherée est lavée à nouveau à l'éther frais. Les diverses fractions étherées sont réunies et par ce procédé on a séparé :

— une fraction alcaline contenant l'œstriol ;

— une fraction organique contenant l'œstrone et l'œstradiol ; cette dernière est mise en présence d'une solution de soude N qui extrait les œstrogènes phénoliques faibles.

Les deux solutions alcalines N/10 et N sont séparément neutralisées par barbotage de gaz carbonique jusqu'à saturation. Puis chaque fraction, reprise successivement à l'éther et à l'alcool, donne une solution alcoolique. La première contenant l'œstriol et la seconde œstrone et œstradiol. Ces solutions sont dosables directement.

Venning (1937) a fait le reproche à Cohen et Marrian d'avoir de grosses pertes en œstrogène au cours des lavages et extractions alcalins.

Procédé de Mather (1940).

Après hydrolyse chlorhydrique et neutralisation, Mather extrait les œstrogènes de l'urine par l'éther. Celui-ci est évaporé, le résidu est repris par une solution de carbonate de soude. La séparation de l'œstrone et de l'œstradiol se fait par extraction au benzène, l'œstriol reste dans la phase alcaline. De la phase

benzénique, Mather extrait ensuite l'œstrone par le réactif T de Girard.

Bachman et Pettit (1941) utilisent un procédé très voisin de celui de Mather. Ils épuisent directement l'urine hydrolysée par le benzène après avoir saturé celle-ci de chlorure de sodium. La solution benzénique est épuisée ensuite avec une solution de carbonate de soude à 9 % qui entraîne la fraction œstriol. La solution benzénique restante est débarrassée de l'œstrone et de l'œstradiol par une solution de soude N. Les deux solutions alcalines sont respectivement neutralisées par HCl jusqu'à $\text{pH} = 6$, la fraction œstriol extraite par l'éther, puis évaporée, est reprise par l'alcool. On obtient une solution alcoolique d'œstriol. La fraction OD extraite par le benzène est évaporée, le résidu repris par l'alcool donne une solution alcoolique d'œstrone-œstradiol.

Venning (1937) a proposé une méthode d'extraction de l'urine des œstrogènes libres et conjugués avant toute hydrolyse. Elle extrait l'urine par l'alcool butylique. La solution butylique est lavée à l'eau, puis évaporée. Le résidu est repris par l'alcool à 90°, puis après l'évaporation de l'alcool, par l'acide chlorhydrique. On hydrolyse à l'autoclave à 120°. Les œstrogènes hydrolysés sont alors extraits par l'éther, la solution étherée est lavée, l'éther est évaporé. Le résidu repris par l'alcool donne une solution alcoolique des trois hormones.

La séparation de l'œstrone de l'œstradiol pour effectuer les dosages des œstrogènes dans l'urine de femme enceinte n'a pas d'intérêt pratique ; néanmoins, de nombreux auteurs l'ont effectuée, utilisant un réactif propre aux cétones (chlorure de triméthyl aminoacétylhydrazide en solution acétique), on obtient un complexe hydrosoluble ainsi séparable de l' α -œstradiol. L'œstrone est régénéré par action de l'acide sulfurique.

De nombreux auteurs ont plus ou moins modifié les méthodes précédemment décrites et ont publié leur technique dans les articles ci-après :

Verdolin (1935), Talbot (1940), Smith, Smith et Schiller (1939), Jayle, Crepy, Judas (1943), Stimmel (1946).

Nous retiendrons seulement la méthode originale de Mayer, qui consiste à additionner à l'urine, au cours de l'hydrolyse chlorhydrique, du benzoate de soude. Il se forme un précipité d'acide benzoïque qui a pour propriété d'absorber les œstro-

gènes libérés par l'hydrolyse. On filtre le précipité, après lavage à l'eau on le dissout dans l'éther et on élimine l'acide benzoïque par addition d'une solution de carbonate de soude à 20 %. L'extrait étheré est évaporé et on obtient ainsi les œstrogènes avec un rendement de 95 %.

III. — Purification des œstrogènes.

Les diverses techniques d'extraction et de séparation donnent des solutions d'œstrogène brutes qui peuvent être soumises directement au dosage. Mais si, pour les dosages biologiques, étant donné leur haute spécificité, ces extraits sont souvent d'une pureté suffisante, il n'en est pas de même pour les dosages chimiques. Nous verrons en particulier pour la réaction de Kober que la coloration spécifique s'accompagnait toujours d'une coloration jaune parasite due aux impuretés et dont l'importance était difficile à évaluer ; aucune des nombreuses méthodes proposées pour son évaluation ne donnant entière satisfaction. Ceci a conduit de nombreux auteurs à chercher une purification de l'extrait brut précédemment obtenu. Les premières techniques mettaient en jeu les coefficients de partage entre deux solvants non miscibles et consistaient à soumettre la solution primitive à un certain nombre d'épuisements. Talbot a effectué jusqu'à 54 épuisements et sa méthode donne inévitablement une perte considérable d'hormones :

La méthode de Engel par séparation à contre-courant a déjà marqué un très grand progrès. Mais seules les méthodes chromatographiques permettent une purification très poussée et nous verrons les nouvelles possibilités qu'elles offrent aux chercheurs.

LES METHODES DE DOSAGE BIOLOGIQUE

Les principaux tests de détection des œstrogènes dans les urines sont les suivants :

TEST D'ALLEN ET DOISY (1922).

C'est le test le plus employé et un des plus anciens. Il repose sur la kératinisation de l'épithélium vaginal. Chez un rat femelle ou chez une souris ovariectomisée, l'épithélium ne subit plus de modification parallèle à celle de l'ensemble du tractus génital, sauf si l'on injecte des substances ayant des propriétés folliculiniques. On observe donc l'action des substances étudiées sur la réapparition des cellules kératinisées et l'apparition des leucocytes.

On lui préfère parfois le test de Doisy et Curtis.

TEST DE DOISY ET CURTIS (1931).

Ce test repose sur le fait que chez les rongeurs impubères, le canal vaginal n'est pas formé. On cherche donc la quantité de substance provoquant le développement du canal vaginal chez la souris ou le rat impubères.

TEST PONDÉRAL BASÉ SUR L'AUGMENTATION DU POIDS DE L'UTÉRUS DE LA RATE IMPUBÈRE.

De jeunes rates sont ovariectomisées et partagées en deux lots. A un premier lot on injecte dans des conditions déterminées la substance œstrogène inconnue. A un deuxième lot on injecte une substance œstrogène étalon. On sacrifie les animaux, on dissèque les utérus, cornes et corps, et on fixe au Boin. Après 24 heures, on pèse et on rapporte le poids de l'organe à 100 gr. d'animal. Les résultats obtenus avec la dose inconnue d'œstrogène sont comparés avec ceux obtenus avec la dose étalon.

Ces trois tests sont les plus importants. On a cependant proposé beaucoup d'autres tests, l'un est basé sur la transformation femelle du plumage du chapon Leghorn mâle sous l'action œstrogène, un autre sur le développement de l'ovopositeur de certains poissons sous l'influence de la folliculine administrée pendant le repos sexuel.

Tous ces tests sont peu pratiques, très longs, nécessitent un élevage important et coûteux, des conditions rigoureuses d'expérimentation si l'on veut obtenir des résultats présentant une certaine fidélité.

Une conférence s'est réunie à Londres le 30 juillet 1932, pour

fixer de manière précise le mode opératoire (compte rendu de Girard). A ce Congrès, on souligna les nombreuses causes d'erreurs : âge des animaux ; durée de leur mise en service, régime alimentaire, température ambiante, succession des injections qu'ils ont précédemment reçues, leur changement de poids après castration, etc...

On ne saurait parler d'unités semblables suivant le test employé. L'œstradiol, qui a une activité 100 fois plus grande que l'œstrone, s'il s'agit du test de Doisy et Curtis, a une activité plus faible s'il s'agit du test d'Allen et Doisy. Il y a donc pour chaque hormone une action propre et différente sur chacun des temps du mécanisme de l'œstrus.

Néanmoins, toutes précautions prises, la méthode biologique a donné d'excellents résultats qui sont comparables dans certains cas avec ceux que l'on obtient par les méthodes colorimétriques. Simonnet prétend qu'elle permet d'apprécier des doses différentes entre elles de 20 UI.

Le plus gros inconvénient de ces tests est qu'ils ne dosent pas l'œstriol, mais seulement l'œstrone et l'œstradiol ; or, depuis les travaux de Marrian (1935) on connaît la prédominance au cours de la grossesse de l'excrétion urinaire de l'œstriol.

LES METHODES COLORIMETRIQUES

LA REACTION DE KOBER

La réaction de Kober est encore, avec diverses modifications, et malgré nombre d'imperfections, la plus utilisée des méthodes de dosage dans la pratique courante.

Elle est due à une constatation fortuite de Kober qui, essayant l'application de la méthode de Liebermann-Salkowsky à l'œstrone et ajoutant de l'eau à ses tubes, dans le but d'un nettoyage ultérieur, constata quelques heures plus tard le développement d'une coloration rose.

Il fit alors l'étude systématique de l'action de l'acide sulfurique sur les œstrogènes lorsque celle-ci est suivie d'une dilution. Il constata que la réaction se fait en deux temps :

1^{er} temps. — Si on ajoute SO_4H_2 concentré à des œstrogènes et que l'on chauffe, il se développe une coloration brunâtre. On laisse refroidir, puis on dilue.

2^e temps. — On réchauffe pour obtenir une coloration rose à fluorescence verte.

Cette coloration est pratiquement spécifique. Elle se produit avec l'œstrone, l'œstradiol et l'œstriol, mais toutefois, l'androstérone la donne aussi de façon moins intense.

Malgré la simplicité apparente de cette réaction, depuis 1931, date de sa découverte par Kober, des quantités considérables de travaux ont été publiées à son sujet et de nombreux auteurs ont apporté des modifications aux techniques initiales dans le but de rendre la méthode quantitative, sensible, fidèle, applicable aux extraits urinaires plus ou moins riches en œstrogène (urine de femme enceinte, urine d'un cycle normal).

Les divers travaux essayant de pallier les inconvénients inhérents à la méthode ont porté sur divers points :

— Eliminer la fluorescence qui accompagne la coloration rose.

— Dresser une technique rigoureuse de temps de chauffage, de température, de nature du diluant, pour donner à la réaction une fidélité maximum et une coloration stable.

— Améliorer les méthodes d'appréciation de la coloration, établir la correspondance entre celles-ci et la quantité pondérale d'œstrogène en cause.

— Eliminer les colorations parasites et en particulier une coloration brune due à l'action de l'acide sulfurique concentré sur les impuretés de l'urine.

Voulant éviter une énumération fastidieuse des diverses techniques qui se sont succédées, nous étudierons celles-ci en fonction des divers points sur lesquels elles ont apporté une modification.

1° LE RÉACTIF.

Kober (1931), dès ses premiers travaux, modifia son réactif qui, initialement, était SO_4H_2 concentré, en ajoutant du phénol dans le but de renforcer la coloration et d'éliminer la fluorescence.

Cohen et Marrian (1934) codifient ce réactif phénol-sulfonique: 36 % de phénol pour 56 % de SO_4H_2 concentré. Ce réactif est encore utilisé et a été repris depuis par Venning (1937).

Kober (1936) publiait l'utilisation d'un nouveau réactif : β -naphtol sulfonique, soit 2,5 gr. de β -naphtol pour 100 gr. de SO_4H_2 .

Szego et Samuels (1940) utilisent un réactif gaïacol sulfonique.

Cohen et Bates (1947) reprennent l'étude systématique de la réaction, montrant que l'addition de phénol n'a jamais renforcé la coloration comme l'avait prétendu Kober en 1931, illusion due à la disparition de la fluorescence. De plus, utilisant les techniques modernes de photométrie, cette fluorescence ne gêne plus les mesures, il est donc indiqué de revenir à SO_4H_2 concentré pur. Ils étudient les courbes d'absorption obtenues avec les diverses méthodes : méthode de Szego (1943) (réactif gaïacol sulfonique), méthode de Venning (1937) (réactif phénol sulfonique) avec la méthode qu'ils utilisent eux-mêmes (réactif SO_4H_2 concentré). Les spectres d'absorption ont des maxima identiques à 5.100 Å. Pour la réaction de Venning, ce maximum est déplacé vers 5.250 Å. Mais la mesure de la fluorescence montre une indéniable diminution par l'utilisation des réactifs phénol et gaïacol sulfoniques.

La méthode de Cohen et Bates a l'avantage de n'utiliser aucun réactif spécial et d'avoir ainsi des résultats reproductibles avec des acides sulfuriques d'origines différentes.

2° LES TEMPS DE CHAUFFAGE.

Kober avait fixé le premier temps de chauffage à 2 minutes au bain-marie bouillant. Le 2^e temps, il ne faisait que porter à l'ébullition.

Cartland (1935) modifie seulement la température du 2^e temps qu'il porte à 125° par l'utilisation d'un bain de glycérine.

Kober (1936) avec le réactif β -naphtol sulfonique, porte alors la température du 2^e temps de chauffage à 125°.

Cohen et Marrian (1934) ont étudié l'importance de ces temps de chauffage, ils admettent qu'un premier temps de chauffage de 10 minutes à 100° est nécessaire, mais constatent que la coloration présenterait une courbe d'intensité en fonction du 2^e temps de chauffage à 100°. Cette courbe ayant un maximum

qu'ils s'efforcent d'atteindre par des mesures se succédant toutes les 30 secondes. Cette méthode est évidemment peu pratique.

Verdollin (1935), reprenant la méthode de Cohen et Marrian, fixe alors le maximum d'intensité pour un 2^e temps de chauffage égal à 3 minutes.

Venning (1937) porte les temps de chauffage au bain-marie à 20 minutes pour le premier et 3 minutes pour le second.

Pincus applique aussi la méthode de Cohen et Marrian, mais supprime totalement le deuxième temps de chauffage. Ils attendent 10 minutes après la dilution pour effectuer la mesure, ils admettent qu'à cet instant la coloration rose s'est normalement développée.

Jayle (1943), utilisant la méthode de Kober de 1936, c'est-à-dire un réactif au β -naphtol, donne un premier temps de chauffage de 2 mn 30 sec. et un 2^e temps de chauffage de 1 mn au bain-marie.

Bachmann (1939) modifie radicalement la méthode de Kober, utilisant un réactif type Cohen et Marrian (56 vol. SO_4H_2 + 36 volumes phénol), dilué par la moitié de son volume d'eau. Ils réduisent la réaction à un seul temps et chauffent à 150° avec une agitation rigoureuse, refroidissant dans la glace avant la dilution avec SO_4H_2 à 30 %. L'auteur admet que chaque œstrogène donne une courbe de coloration qui lui est propre en fonction du temps de chauffage. Pour un temps de chauffage de 9 mn 1/2, les trois courbes passent par un même point et il conviendrait de s'en tenir à ce temps pour avoir une estimation convenable d'un mélange d'œstrogène. La mesure doit se faire très rapidement après chauffage et dilution, car la réaction se poursuit à froid.

Cohen et Bates (1947) sont seuls à avoir fait l'étude systématique des deux temps de chauffage. Leur réactif est l'acide sulfurique concentré pur. Ils tracent les 5 courbes de variation de l'intensité de la coloration en fonction du deuxième temps de chauffage. Ces 5 courbes correspondant respectivement à des premiers temps de chauffage de : 1 mn, 2 mn, 4 mn, 6 mn, 8 mn. Ils concluent que le maximum de coloration se trouve réalisé pour un premier temps de chauffage de 6 mn et un 2^e temps de chauffage de 3 mn, mais qu'une augmentation légère de ces temps de chauffage ne diminue pas sensiblement l'intensité de la coloration. S'ils choisissent une température de 100°,

c'est en vertu de la commodité du bain-marie, mais une température supérieure ou inférieure peut donner les mêmes résultats si l'on diminue ou augmente corrélativement les temps de chauffage. Ceci est démontré par le fait que l'on peut soit utiliser un deuxième temps de chauffage à 100° pendant 3 minutes ou laisser la solution à la température de la pièce pendant 1 heure.

3° L'AGENT DILUANT.

Kober dans sa technique initiale utilisait l'eau, Cohen et Marrian utilisent l'acide sulfurique dilué (5 %). Kober, dans la technique au β -naphtol, utilise l'acétone au demi. De même, Jayle utilise l'acétone. Venning utilise l'eau. Bachmann utilise l'acide sulfurique dilué selon les proportions suivantes : SO_4H_2 concentré 3 vol. pour 1 vol. d'eau.

Cohen (1947) fait l'étude systématique du 2^e temps de la réaction de Kober en fonction du diluant. Il trace les courbes d'intensité d'absorption de la solution en fonction de la longueur d'onde pour des diluants allant de la concentration SO_4H_2 90 % à eau 100 %. Ces courbes sont diphasiques, présentant 2 maxima, l'un vers 4.250 A dans la bande du bleu, l'autre vers 5.100 A dans le vert, ce dernier étant seul mesuré pour apprécier la coloration de Kober. Pour un diluant à 90 % de SO_4H_2 , l'absorption à 4.520 A est maximum et l'absorption à 5.100 A est très faible ou nulle. A mesure que l'on dilue les solutions d'acide sulfurique utilisé, l'absorption dans la région du bleu décroît et l'absorption dans la région du vert augmente. Avec une dilution de 25 % de SO_4H_2 + 75 % H_2O , ils ont obtenu un maximum d'absorption à 5.100 A et le minimum à 4.250 A. Avec des solutions plus diluées d'acide sulfurique ou avec l'eau distillée, on obtient des courbes du même ordre, mais l'intensité de la coloration rose est plus faible.

4° LES MÉTHODES D'APPRÉCIATION DE LA COLORATION.

Kober (1931) utilisait un témoin au rouge crésol acide.

Cohen et Marrian (1934) suppriment l'utilisation de cet étalon difficilement comparable à la coloration rose de la réaction de Kober et utilisent le tintomètre de Lovibond.

Cartland et Coll. (1935) utilisent des témoins préparés dans les mêmes conditions avec des solutions connues d'œstrogène.

Pincus (1936) utilise le photomètre de Pulfrich, dresse à chaque détermination une courbe d'étalonnage avec une solution d'hormone pure et établissant le spectre d'absorption de la réaction colorée soustrait de l'absorption maximum à 5.000 Å, l'absorption présumée de l'extrait urinaire par l'interpolation de la fraction de courbe de 5.000 Å à 5.800 Å, ce qui permet d'éliminer la proportion due au matériel inactif.

Venning (1937) fait une première lecture à l'électrophotomètre à 5.220 Å à l'aide d'un filtre vert approprié et une deuxième lecture à 4.300 Å à l'aide d'un filtre bleu. L'absorption à 4.200 Å correspond au composant brun de l'extrait urinaire, l'absorption à 5.220 Å correspond à la somme des absorptions :

impuretés urinaires + coloration rouge de Kober

A partir des absorptions à 4.200 Å on calcule l'absorption à 5.220 Å et en soustrayant le chiffre obtenu de l'absorption totale à 5.220 Å, on obtient l'absorption due à la coloration rose de Kober seule.

Pour Kober (1936) la réaction suivrait la loi de Lambert-Béer dans des limites assez étroites, une courbe d'étalonnage étant superflue, on calcule un coefficient moyen reliant l'absorption à la concentration.

5° LE PROBLÈME DES IMPURETÉS COLORÉES.

Par action de l'acide sulfurique sur les composés organiques de l'urine accompagnant les œstrogènes même après purification, il se développe une coloration brune présentant un maximum d'absorption à 4.000 Å et se répartissant sur tout le spectre.

Cohen et Marrian (1934) proposent de détruire le pigment rose caractéristique en traitant le mélange réactionnel par l'eau oxygénée (0,5 cc. à 5 %). Ils chauffent 2 mn et répètent la mesure après ce traitement. La différence entre la première et la deuxième mesure donne l'intensité de la coloration rose. Mais pour nombre d'auteurs la coloration brune serait également altérée (Bachmann et Pettit).

Caro (1947) traite aussi par H_2O_2 au 1/10, effectue la mesure 30 mn plus tard, mais la décoloration ne serait pas complète.

Jayle (1913) préfère l'acétone, qui détruit la coloration en quelques heures à l'obscurité. Mais il se produirait souvent des floculations entre la première et la deuxième lecture.

Stevenson (1947) chauffe un mélange réactionnel témoin 1 heure 1/2 à 100 ° ; il y a dans ces conditions disparition totale de la coloration rose.

Stimmel (1946) et Salter (1948) proposent un lavage du mélange avec des solvants non miscibles à l'acide sulfurique qui enlèveraient les impuretés sans affecter le pigment rose (ils utilisent en particulier l'acétate d'éthyle).

La méthode de Venning utilisant un électrophotomètre qui mesure l'absorption à 4.200 A (absorption due aux impuretés) et celle à 5.220 A (due aux impuretés + pigment rose) évite tout traitement du mélange.

Bachmann et Pettit discutent la méthode de Venning montrant que celle-ci n'est applicable que dans certaines limites, la concentration en œstrogène de l'urine à analyser étant suffisamment importante (c'est le cas de l'urine de femme enceinte) pour que le rapport

$$\frac{\epsilon_{5.200 \text{ A}}}{\epsilon_{4.200 \text{ A}}} \text{ soit supérieur à } 3.$$

ϵ représente le coefficient d'extinction aux longueurs d'ondes 5.200 A et 4.200 A.

LES METHODES FLUORIMETRIQUES

I. — DIVERSES TECHNIQUES.

Dès 1930, Marrian constatait la fluorescence des œstrogènes avec l'acide sulfurique.

En fait, les œstrogènes sont fluorescents par réaction avec les déshydratants, on distingue les réactions de fluorescence avec :

- l'acide sulfurique,
- l'acide phosphorique,
- le chlorure de Zinc.

a) *Réaction de fluorescence avec l'acide sulfurique :*

Jailer (1947) décrit une méthode d'obtention de la fluorescence de solutions d'œstrone ou d'œstradiol par addition de 8 cc. de SO_4H_2 à 60 % à 1 cc. d'une solution alcoolique (méthanol) contenant environ 0,25 μgr d'œstradiol, puis chauffage de 5 minutes à l'ébullition. La fluorescence développée par l'œstriol dans les mêmes conditions est très faible (20 fois moins), d'autres stéroïdes donnent une fluorescence négligeable.

Bates et Cohen (1947) décrivent une méthode similaire, seuls les concentrations de SO_4H_2 et les temps de chauffage sont différents. En 1950, ces mêmes auteurs donnent les conditions précises d'application de leur méthode. La concentration de SO_4H_2 sur les résidus secs devant être de 60 à 70 % en volume sur des solutions d'œstrogènes dans 0,1 cc. d'alcool, de NaOH N ou d'eau, ils utilisent un cc. de SO_4H_2 90 %, ils chauffent au bain-marie pendant 10 mn à 80° pour développer la fluorescence maximum, après chauffage, ils diluent avec SO_4H_2 65 % V/V et effectuent la lecture quelques minutes après la dilution. Les intensités relatives des trois œstrogènes sont :

œstrone 100 % ;
œstradiol 83 % ;
œstriol 34. %

Leur technique s'appuie sur les faits suivants :

La concentration de SO_4H_2 qu'utilise Jailer est insuffisante pour donner le maximum de fluorescence. Un chauffage à 80° pendant 10 mn est préférable au chauffage à 100° pendant 5 mn. Mais surtout, si la concentration de l'acide doit être de 80 % pour développer la fluorescence, il est nécessaire de diluer rapidement pour obtenir une concentration finale de 70 % de SO_4H_2 . Concentration qui donne le maximum de stabilité à la fluorescence.

Les solvants des œstrogènes utilisables sont : l'eau, l'alcool éthylique, l'alcool méthylique, l'éther, le chlorure d'éthylène, le benzène, le toluène, mais non l'acétone ni les alcools en C 3 ou plus.

Engel, Slauwhite (1949) et (1950) dissolvent les œstrogènes dans le mélange toluène (19 vol.) et alcool absolu (1 vol.). Ils utilisent le méthode de Bates et Cohen, mais chauffent 10 mn

à 100°. Le toluène donnerait une fluorescence supérieure à celle obtenue avec des solvants miscibles à SO_4H_2 (méthanol). Il doit être additionné d'alcool pour dissoudre l'œstriol qui y est insoluble.

Eichenberger (1949) donne une variante très intéressante d'application des réactions de fluorescence au dosage des œstrogènes pendant la grossesse. Ce procédé est intéressant par sa rapidité et la facilité de son exécution, il donnerait un reflet des concentrations hormonales dans l'urine.

Après extraction des œstrogènes et séparation selon les procédés de Bachmann et Pettit, 1 cc. de chacune des fractions dans l'alcool sont additionnées de 2 cc. de SO_4H_2 90 % et chaque tube est porté au bain-marie 5 minutes. Après refroidissement, on l'examine aux ultra-violets. La fraction OD a une fluorescence verte, la fraction T a une fluorescence rouge. On répète le dosage avec des fractions de plus en plus diluées d'hormones et on recherche ainsi le seuil de fluorescence. La valeur de ce seuil serait de 0,1 γ pour OD et de 0,3 γ pour l'œstriol. L'essentiel de la méthode consiste donc au remplacement d'une mesure directe de fluorescence par une dilution progressive ; ainsi est évitée une mesure délicate nécessitant un appareil coûteux. Cependant la méthode s'est montrée difficilement utilisable, elle manque de sensibilité, le coefficient d'erreur personnel de l'opérateur est considérable et les dilutions successives ont pour résultat de multiplier cette erreur.

b) Réaction de fluorescence avec l'acide phosphorique :

Finkelstein (1948) utilise l'acide phosphorique à la place de l'acide sulfurique. Il donne ainsi à la réaction une spécificité plus grande et une grande sensibilité. Contrairement à la méthode de Jailer, la méthode de Finkelstein dose l'œstriol. Son emploi est délicat et nécessite un milieu rigoureusement anhydre et l'obscurité.

L'extraction et la séparation des fractions OD et T se font par la méthode Bachmann et Pettit, puis les solutions alcooliques sont évaporées à 120° jusqu'à siccité, après refroidissement, addition de 7 cc. de PO_4H_3 , chauffage au bain-marie 1/2 heure à l'obscurité, puis refroidissement et mesure de la fluorescence au photofluorimètre de Coleman.

Boscott (1948) donne une méthode semblable à celle de

Finkelstein, mais sans chauffage, intéressante seulement pour de hautes concentrations en œstrogène.

c) Réaction de fluorescence avec le chlorure de zinc :

Garst, Nic. Maron, Freedgood, proposent une réaction de fluorescence basée sur la condensation de l'anhydride phthalique avec les œstrogènes en présence de chlorure de zinc.

d) Autres réactions de fluorescence :

Dhere, Laszt (1947) ont décrit une réaction de fluorescence avec le sulfate neutre de méthyle.

Boscott (1949) décrit une réaction avec l'acide formique.

II. — APPLICATION DES MÉTHODES AUX EXTRAITS URINAIRES.

Jailer avait remarqué que le dosage des œstrogènes dans les urines d'homme ou de femme après la ménopause donnait des chiffres considérablement trop élevés du fait d'une fluorescence parasite. Il corrige les résultats obtenus par une recherche de la valeur de cette fluorescence parasite. Il s'appuie sur l'hypothèse suivante : la fluorescence due aux œstrogènes est uniquement excitée par une longueur d'onde de 4.358 Å, alors que la fluorescence due aux substances étrangères (solvant, réactif ou impuretés de l'urine) ne varie pas en changeant la longueur d'onde de l'excitation, il mesure cette dernière à 3.650 Å.

Ce phénomène très important pour les dosages de quantités faibles d'hormones, l'est moins lorsqu'il s'agit d'urine de femme enceinte.

Bates et Cohen ont tenté de mesurer cette fluorescence parasite en traitant les extraits urinaires par SO_4H_2 65 % sans chauffer. Ils pensent que dans ces conditions les œstrogènes ne réagissent pas et que par contre les substances étrangères donnent la même fluorescence que par traitement avec SO_4H_2 90 % et chauffage. En réalité, cette hypothèse paraît fragile et n'a pas donné les résultats escomptés.

Finkelstein, bien qu'utilisant une méthode qui donne une fluorescence parasite moindre que la précédente, a néanmoins, dans une communication en 1951, recommandé la comparaison des fluorescences obtenues avec des raies excitatrices à 4.358 Å et 3.650 Å.

Braunsberg (1952) compare les 1 méthodes principales, celle de Jailer, Bates et Cohen, Engel et Finkelstein. Il arrive aux conclusions suivantes : la méthode de Bates et Cohen est de beaucoup la plus sensible, mais elle est très influencée par les impuretés de l'urine qui absorbent une partie de la fluorescence, elle nécessite une purification très poussée. La méthode de Engel donnerait une sensibilité moindre du fait de la présence de toluène. La méthode de Jailer donne des résultats très reproductibles, mais une sensibilité inférieure à la méthode de Bates et Cohen. La méthode de Finkelstein, par contre, a l'avantage de permettre des dosages sur des extraits moins purifiés. Mais aucune de ces méthodes ne donne des courbes superposables pour chacun des trois œstrogènes et il est ainsi impossible d'obtenir des dosages « d'œstrogènes totaux ».

De plus, à chaque méthode correspond une sensibilité propre de chaque œstrogène. Ainsi par la technique de Bates et Cohen, la sensibilité décroît dans l'ordre suivant : œstrone, œstradiol, œstriol, alors que dans la méthode de Engel, pourtant très voisine, l'œstrone a une sensibilité supérieure à l'œstriol, qui est lui-même supérieur à l'œstradiol. Il est donc nécessaire d'établir pour chaque méthode les courbes d'étalonnage. Chaque œstrogène devrait être dosé séparément, d'où l'importance de la méthode de purification et de séparation.

Engel et coll. semblent avoir donné la méthode de purification la plus satisfaisante jusqu'alors. Ils appliquent une méthode basée sur le principe de la séparation à contre-courant. Les méthodes chromatiques semblent aussi devoir donner d'excellents résultats (Swyer et Braunsberg, 1951) (Bitman et Sykes, 1953).

Goldzieher montre qu'il est possible d'utiliser les différences des spectres de fluorescence des œstrogènes pour effectuer une différenciation optique des trois œstrogènes dans un mélange. Ils tracent la courbe de l'intensité de la fluorescence en fonction de la longueur d'onde de la lumière d'excitation et montrent que si, pour une raie d'excitation de 4.700 Å, l'intensité de la fluorescence est identique pour l'œstrone et l'œstradiol, la fluorescence, pour une raie d'excitation de 4.400 Å, est 10 fois plus importante pour l'œstradiol que pour l'œstrone. La valeur de la fluorescence de l'œstriol est toujours beaucoup plus faible.

Le Clerc étudie les facteurs influençant la réaction de fluores-

cence, son évolution dans le temps, l'influence de la température, des conditions de chauffage, de la concentration de l'acide, du volume d'alcool et de la nature du solvant.

En conclusion, ce type de méthode présenterait une grande sensibilité, mais nécessiterait une purification très poussée et une séparation totale des trois hormones.

Dans les conditions normales de purification, il apparaît qu'une fraction importante et variable de la fluorescence mesurée est due à d'autres substances accompagnant les œstrogènes. Les impuretés, d'autre part, exerceraient vis-à-vis de la fluorescence spécifique des œstrogènes un pouvoir inhibiteur variable avec chaque extrait, qui en masque une partie. Il en résulte une part d'inconnu très grande et variable dont les divers artifices techniques proposés, malgré une augmentation considérable de la difficulté des manipulations, n'ont apporté que des solutions incomplètes.

NOUVELLES METHODES DE DOSAGE

Les dosages par spectrophotométrie dans l'U.V. et dans l'I.R. et la polarographie ne sont utilisables qu'après une purification presque parfaite des extraits urinaires et la séparation des trois œstrogènes, d'où la mise au point de nouvelles techniques de purification et de séparation. Ces techniques sont groupées sous le nom de chromatographie. En réalité on doit distinguer :

- la chromatographie de partage ;
- la chromatographie d'adsorption.

Les principes de ces deux variétés de chromatographie sont entièrement différents, mais elles conduisent toutes deux à des manipulations de même ordre, c'est pourquoi on distingue dans l'un et l'autre cas :

- a) la chromatographie sur colonne ;
- b) la chromatographie sur papier.

I. — La chromatographie de partage.

PRINCIPE.

La chromatographie de partage permet la séparation des diverses fractions œstrogènes des impuretés qui les accompagnent au moyen de deux solvants non miscibles :

- un solvant fixe ;
- un solvant mobile.

Cette séparation est basée sur le comportement respectif des différents produits à séparer vis-à-vis des deux solvants. La phase stationnaire contenant l'extrait à purifier imprègne la colonne ou le papier, tandis que la phase mobile chemine, entraînant les produits déposés selon leur coefficient de partage.

TECHNIQUES.

a) *La chromatographie de partage sur colonne :*

Stern et Swyer (1952) utilisent une colonne de « Celite 535 » lavée au préalable avec un mélange chloroforme butanol (3 parties de chloroforme pour une partie de butanol). La phase stationnaire est constituée d'une solution de soude 2 N. La phase mobile est constituée par du benzène et traverse la colonne sous pression. Dans ces conditions, le benzène est capable d'extraire et d'entraîner l'œstrone et l'œstradiol, mais l'œstriol reste dans la phase stationnaire. Quand les dernières traces de benzène ont atteint le haut de la colonne, celle-ci est lavée avec 4 fois 0,5 cc. de mélange chloroforme-butanol, de façon à extraire l'œstriol.

Bitman et Sykes (1953) reprennent la technique précédente et signalent qu'étant donné le caractère hydrophile beaucoup plus net de l'œstriol, celui-ci n'est pas extrait avec l'œstrone et l'œstradiol par le benzène. Il est nécessaire de trouver un système de partage plus favorable pour séparer l'œstriol. Cette extraction peut être achevée de deux façons :

- en changeant la phase mobile ;
- en changeant la phase stationnaire.

Dans le procédé de Stern et Swyer, décrit ci-dessus, c'est la phase mobile qui est modifiée après extraction de l'œstrone et de l'œstradiol, le benzène étant remplacé par une solution chloroforme-butanol. Il serait possible aussi d'utiliser l'acétone, le dichloréthylène ou le méthanol. Cette technique ne donne pas entière satisfaction, le 2^e solvant et en particulier le butanol dissout de nombreuses impuretés qu'il entraîne avec la fraction œstriol. C'est pourquoi Bitman et Sykes ont proposé de modifier la phase stationnaire après élution de l'œstrone et de l'œstradiol. Dans ce but, ils font passer un courant de gaz carbonique sur la colonne qui permet un abaissement du pH du milieu par transformation de la soude en bicarbonate ; il est possible dans ces conditions d'extraire tout l'œstriol restant par le benzène.

Dans les conditions expérimentales déterminées par Bitman et Sykes, l'œstrone présente un coefficient de partage nettement plus favorable pour le benzène que celui des deux autres œstrogènes. On recueille des fractions successives du benzène. Selon les auteurs, ces fractions séparent les œstrogènes de la façon suivante :

- Fraction I : 30 cc. de C_6H_6 ne contient aucun œstrogène.
- Fraction II : 80 cc. de C_6H_6 en principe contient tout l'œstrone.
- Fraction III : 10 cc. de C_6H_6 ne contient aucun œstrogène.
- Fraction IV : 90 cc. de C_6H_6 contient l'œstradiol.

A ce moment, passage du courant de gaz carbonique (débit de 30 cc. à la minute, pendant 5 minutes).

- Fraction V : 100 cc. de C_6H_6 contient tout l'œstriol.

Les diverses fractions sont recueillies et sont évaporées jusqu'à siccité sous pression réduite à 50°. Les résidus œstrogéniques peuvent être dissous dans l'éther en vue du dosage.

b) *La chromatographie de partage sur papier :*

La chromatographie de partage sur papier n'est valable que pour de très petites quantités de substances à séparer. C'est ce qui fait son intérêt en microchimie. On utilise, de même que dans la chromatographie sur colonne, deux solvants non misci-

bles. On dépose sur le papier les produits à séparer. La phase stationnaire imprègne le papier, tandis que la phase mobile entraîne les produits déposés suivant leur coefficient de partage, on obtient ainsi, si les conditions de la chromatographie sont bonnes, des taches bien délimitées et franchement séparées que l'on révèle par un réactif approprié.

Nous citerons quelques travaux sur ce sujet, signalons cependant que ces méthodes, valables pour séparer les trois œstrogènes cristallisés dans un mélange, ne sont pas applicables directement à un extrait urinaire très impur.

Burton, Zaffaroni, Keutman séparent l'œstrone après transformation en dérivés hydrosolubles par le réactif de Girard, le système de solvant utilisé est : butanol-eau. La détection des taches se fait par l'iodure de platine. La méthode est uniquement valable pour l'œstrone.

Heftman (1950) obtient des dérivés hydrosolubles par couplage avec une diazo, le système de solvant est : toluène, éther de pétrole-éthanol, eau.

Boscott (1951) utilise également la chromatographie ascendante sur papier pour séparer les œstrogènes des acides phénoliques et de substances urinaires non déterminées qui gênent le dosage fluorimétrique.

Busch (1950) sépare la progestérone, l'œstrone et l'œstradiol par le benzène. Il détecte les taches avec une solution saturée d'iode dans le pétrole.

Mais seule la méthode de Heusghem (1952) pourrait être utilisable sur les extraits urinaires. Il utilise une technique de séparation dans laquelle la phase fixe est de l'ammoniaque normale. Le papier sur lequel ont été déposés les œstrogènes est imprégné totalement de NH_4OH N. L'atmosphère dans laquelle baigne le papier est saturée de gaz ammoniac. La phase mobile est constituée par une solution à 10 % de chloroforme dans le benzène et saturée d'ammoniac. L'œstriol, plus soluble en milieu aqueux et alcalin, aura tendance à rester en son point de dépôt, tandis que le solvant organique (C_6H_6) choisi de façon que l'œstrone et l'œstradiol y soient plus solubles que l'œstriol, entraîne ces deux stéroïdes avec lui. De ce fait, par le jeu des solubilités différentes des deux stéroïdes vis-à-vis des deux liquides utilisés, une séparation franche peut être obtenue.

Une séparation du même genre peut être obtenue en uti-

lisant comme phase stationnaire le mélange méthanol (10) et eau (20), dans ce cas les coefficients de distribution de l'œstrone et de l'œstradiol sont plus voisins.

DÉTECTION DES TACHES.

Il semble que la technique de Heusghem, utilisant SbCl_3 , donne de bons résultats. Il obtient un spot brun pour l'œtrone, jaune pour l'œtradiol et rose pour l'œstriol.

Une nouvelle technique de Boute consiste à transformer les œstrogènes en nitrosodérivés et à les solubiliser par action de l'ammoniac.

Une autre technique de dosage après chromatographie sur papier consiste à éluer les bandes de papier découpées transversalement. C'est la méthode du chromatogramme découpé.

Ghilain et Boute éluent les différentes bandes de papier obtenues avec l'alcool absolu et soumettent la solution à la réaction de Kober modifiée par Jayle.

Heusghem élue par cheminement sur le chromatogramme découpé d'un mélange à parties égales de chloroforme et d'acétone et dose par la méthode polarographique après obtention des dérivés nitrosés.

II. — La chromatographie d'adsorption.

PRINCIPE.

On utilise les propriétés adsorbantes d'une colonne (silice-alumine, kaolin) ou du papier. Un solvant ou un mélange de solvant miscible vient au contact des produits à séparer déposés et les entraîne suivant leur solubilité respective.

TECHNIQUE.

a) *Chromatographie d'adsorption sur colonne :*

Heintzberger adopte la technique suivante : les urines de 24 heures, hydrolysées, sont extraites à l'éther. On sépare la fraction cétonique de la fraction non cétonique par le réactif T de Girard. Les deux fractions sont chromatographiées sépa-

rément sur terre décolorante (variété de kaolin). L'œstrone est élue au moyen du benzène de la fraction cétonique. De la fraction non cétonique, on élue successivement l'œstradiol et l'œstriol par un mélange benzène-éther, puis par un mélange éther-éthanol. Les dosages se font par une variante de la réaction de Kober. Cette méthode est applicable aux urines de la femme enceinte à partir du troisième mois. A côté de l'œstrone, l'auteur a pu isoler par ce fractionnement une substance inconnue Kober positive. Ce procédé n'est pas utilisé en clinique.

Stimmel a décrit un procédé analogue apparemment moins sensible que le précédent. L'adsorption se fait ici sur colonne d'alumine activée. L'œstrone est dosé par la réaction de Zimmermann, l'œstradiol par la réaction de Kober, et l'œstriol par le réactif de Bachmann. Le procédé est applicable aux urines pendant la grossesse.

b) Chromatographie d'adsorption sur papier ou capillarographie :

Heusghem entraîne les différents œstrogènes par une solution alcaline dans une chromatographie ascendante, il préconise la solution de soude N/20 qui donnerait la meilleure séparation, mais d'autres bases minérales (NH_4OH) ou organique, pyridine (15 % dans l'eau) pourraient donner de bons résultats. Ils étudient aussi une capillarographie à l'aide de solvants organiques et montrent que des solutions de méthanol à 25 % et à 35 % dans l'eau donnent une bonne séparation.

Quoi qu'il en soit, Heusghem conclut :

« L'utilisation de la capillarographie pour la séparation des trois œstrogènes naturels demeure en pratique limitée à certains cas particuliers. Ceci pour deux raisons principales :

— On observe souvent, lorsqu'on opère sur des quantités d'hormones supérieures à 15 ou 20 $\mu\text{g.}$, des elongations des spots. En chargeant le solvant en électrolytes, par addition de chlorure de sodium par exemple, on obtient des spots mieux délimités, mais dans ce cas les Rf sont abaissés.

— Lorsqu'on opère sur des mélanges d'hormones, les différents stéroïdes ne présentent pas toujours les mêmes Rf qu'en solution pure et leur séparation n'est pas franche. La solubilisation semble très nettement influencée par la présence des

autres hormones. Pratiquement nous retiendrons que, seule, la séparation œstrone-œstradiol est réalisable avec de bons résultats par la soude N/20 ainsi que par la solution à 33 % de méthanol dans l'eau.

La séparation est plus aisément réalisable lorsqu'on s'adresse à la chromatographie de partage, qui permet l'obtention de spots bien délimités et franchement séparés ».

III. — Spectrophotométrie ultraviolette.

Les résultats de spectrophotométrie rapportés dans la littérature sont confus du fait de l'impureté des échantillons examinés.

En 1936, Callow notait que les trois œstrogènes ont en solution alcoolique à 0,01 % un maximum d'absorption vers 2.800 Å. Celui-ci se déplaçant vers 2.950 Å en solution alcaline (NaOH N/100). Il est admis que ce déplacement du spectre est dû au passage d'une « forme acide » à la « forme alcaline » par salification de la fonction phénol.

Friedgood (1948) donne sur les spectres d'absorption des indications précises. Les trois œstrogènes, œstrone, œstradiol et œstriol, ont, en solution dans l'alcool à 95 %, des courbes d'absorption très voisines. À côté du maximum à 2.800 Å, se trouve un deuxième maximum à 2.880 Å, du côté des petites longueurs d'ondes on trouve un maximum à 2.300 Å. Seule la longueur d'onde du minimum d'absorption varie avec l'œstrogène :

œstrone	2.480 Å	œstriol	2.520 Å
œstriol			

L'œstrone a un coefficient d'absorption plus fort que l'œstradiol, dû probablement à sa fonction cétone.

Friedgood dose les œstrogènes à 2.800 Å après une purification très poussée.

Le Clerc étudie la variation des spectres en fonction du pH du milieu, et en particulier cherche à déterminer le pH minimum à partir duquel l'œstrogène peut être considéré comme étant entièrement sous sa forme alcaline. Il détermine les spectres d'absorption des trois œstrogènes, leur coefficient

d'absorption dans l'alcool, et leur variation en fonction de l'alcalinité du milieu et ne constate aucune différence de comportement entre les trois œstrogènes.

$$\begin{array}{l} \text{pH} = 1 \\ \text{pH} = 6 \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} \text{pH} = 1 \\ \text{pH} = 6 \end{array}} \right\} \text{Maximum } 2.812 \text{ A}$$
$$\text{pH} = 13 \quad \text{Maximum } 3.000 \text{ A}$$

Il existe un petit maximum en milieu acide ou neutre à 2.890 A. L'absorption est plus grande en milieu alcalin qu'en milieu neutre et surtout à un pH supérieur à 12.

En milieu acide, il n'y a pas d'absorption à 3.000 A et par conséquent, dans la zone de virage, toute absorption à 3.000 A est due à la forme alcaline, d'où le calcul possible pour chacun des trois œstrogènes du pourcentage de la forme alcaline et de la forme acide à chaque pH.

Il est impossible de séparer les trois œstrogènes par les courbes d'absorption dans l'UV. On peut seulement les doser globalement en choisissant un coefficient d'absorption moyen. Cette méthode s'adapte mal à des fins de dosage en milieu biologique, car si on peut corriger l'absorption des impuretés en comparant l'absorption en milieu acide et en milieu alcalin (les impuretés n'étant pas influencées par le changement de milieu), en fait, les impuretés absorbent plus que les œstrogènes à 3.000 A pour des extraits normalement préparés et il faut des précautions de préparation extraordinaires pour obtenir des résultats valables.

IV. — Spectrophotométrie infrarouge.

Les spectres d'absorption dans l'infra-rouge permettent, par leurs nombreuses bandes d'absorption, de caractériser les principales fonctions chimiques et la structure interne des molécules. Pour conclure à la présence d'un œstrogène, on doit avoir les diverses bandes caractéristiques des stéroïdes, mais aussi une bande à 6,25 μ du noyau benzénique et à 8 μ du groupement phénolique.

Carol et Molitor ont établi une technique permettant le dosage de l'œstrone et du 17 œstradiol dans les urines de jument gravide. Ils transforment les œstrogènes en dérivés solubles par

simple contact de ceux-ci en solution pyridinique avec le chlorure de benzène sulfonyle et obtiennent presque quantitativement des benzènes sulfonates.

La détermination de la composition du mélange se fait par mesure des flèches d'absorption.

V. — Dosage polarographique.

Citons les travaux de Wolfe, Hershberg et Fischer, qui dosent les produits de condensation des cétostéroïdes 17 avec le réactif T de Girard par la méthode polarographique ; et les travaux de Heusghem sur le dosage des dérivés nitrosés après chromatographie de partage sur papier.

CHAPITRE III

RESULTATS FOURNIS PAR LES DIFFERENTES METHODES DE DOSAGE DES ŒSTROGENES URINAIRES AU COURS DE LA GROSSESSE NORMALE

Quelques réflexions préalables s'imposent :

Pour que les résultats obtenus par les différents auteurs soient comparables,

— L'âge de la grossesse doit être défini convenablement ;

— Le taux d'œstrogène doit être défini par une unité identique pour tous, exprimant le taux d'un corps dont la nature est chimiquement déterminée.

DÉFINITION DE L'ÂGE DE LA GROSSESSE :

Pour notre part, nous admettons que celle-ci débute au jour probable de la fécondation, soit dix jours après le premier jour des dernières règles. Nombre d'auteurs comptent l'âge de la grossesse à partir du premier jour des dernières règles et ceci n'est même pas notifié dans de nombreuses publications.

DÉFINITION DE LA NATURE DE L'ŒSTROGÈNE DOSÉ ET DE L'UNITÉ DU RÉSULTAT EXPRIMÉ :

a) *Les dosages biologiques :*

Ce qui est mis en évidence au cours du dosage, c'est l'activité biologique. Or cette activité est différente pour chacun des trois œstrogènes, elle est nulle pour un certain nombre de métabolites, reflète urinaires du métabolisme de ceux-ci.

Pour utiliser le test d'Allen et Doisy, on définit une unité souris ou une unité rat par le taux minimum d'œstrogène à

injecter à l'animal ovariectomisé pour rétablir l'œstrus. Cette unité biologique est rapportée à l'unité internationale de pouvoir œstrogène U.I.

$$\text{U.I.} = 0,10 \text{ d'œstradiol}$$

Et on admet généralement

$$1 \text{ U.I.} = 1 \text{ unité souris} = 1/10 \text{ unité rat.}$$

b) *Les dosages chimiques :*

Plusieurs cas se présentent.

Aucune séparation n'est effectuée, la purification est sommaire, des métabolites ou œstroïdes sans activité biologique accompagnent les trois œstrogènes.

Jayle les a définis sous le nom de « phénolstéroïdes totaux ».

— La purification est aussi sommaire, mais une photométrie différentielle permet d'éliminer les substances d'accompagnement sans activité biologique.

Jayle a exprimé ces résultats en γ de « folliculine ».

— On effectue une purification et une séparation par différence de solubilité dans les solutions alcalines et on obtient deux fractions dites :

l'une phénolique forte, qui contient l'œstriol,

l'autre phénolique faible, qui contient l'œstrone et l'œstradiol.

Les résultats s'expriment alors en γ d'œstriol pour la première fraction et en γ d'œstrone pour la deuxième fraction.

c) *Les dosages de laboratoires de recherches spécialisés :*

Ceux-ci combinent les méthodes physiques et chimiques pour obtenir une purification très poussée et une séparation quantitative des trois œstrogènes. Les résultats s'expriment alors en

γ d'œstradiol pur,

γ d'œstrone pur,

γ d'œstriol pur.

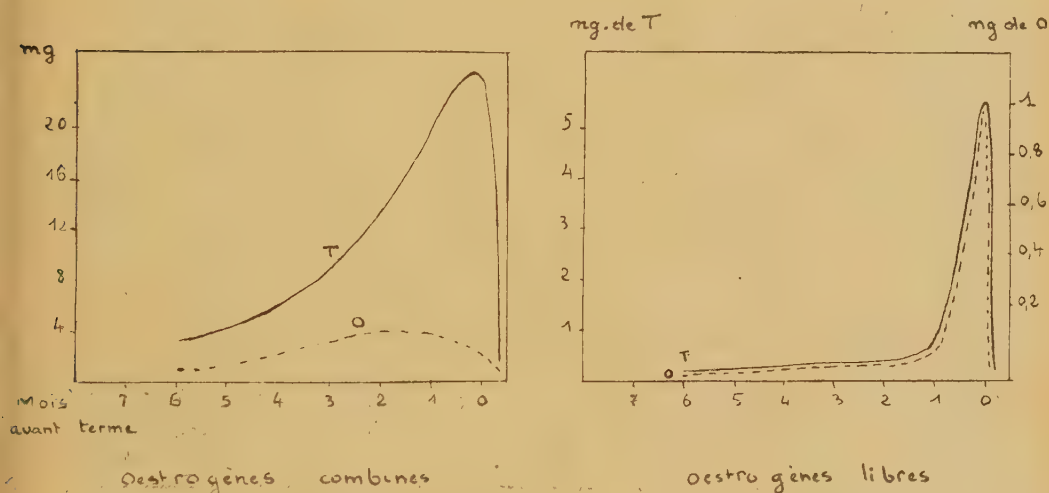
Mais ces méthodes sont encore à l'étude et resteront encore longtemps inabordables pour les laboratoires de clinique limités dans leurs possibilités.

Il résulte de ce qui précède que la normalisation dans les techniques et même dans l'expression des résultats n'est pas

encore effectuée. C'est donc avec un esprit de compréhension large, s'appuyant plus sur une interprétation clinique que sur des données numériques, que nous devons comparer les résultats obtenus par les divers laboratoires.

I. — Résultats des divers auteurs.

Ascheim et Zondeck (1928), avec des techniques biologiques très imprécises, montrent que l'excrétion des œstrogènes s'élève à partir du troisième mois, se maintient très élevée pendant toute la grossesse pour s'abaisser très rapidement après l'accouchement.



Cohen, Marrian, Watson (1935) séparent les œstrogènes libres de l'urine, puis extraient les œstrogènes combinés après hydrolyse. Dans chacune de ces fractions, ils séparent l'œstriol de l'œstrone et l'œstradiol, qui existe à un taux très faible, accompagnant l'œstrone. L'excrétion des œstrogènes libres est extrêmement faible pendant les huit premiers mois de la grossesse, représentant moins de 1 % de la quantité correspondante d'œstrogène combiné. Peu de temps avant l'accouchement, la quantité d'œstrogène libre s'accroît au moment où l'excrétion des œstrogènes combinés diminue. 24 heures après l'accou-

chement, la proportion des formes libres est supérieure à celle des formes combinées.

Sur 80 échantillons urinaires prélevés chez 20 femmes enceintes, ils montrent qu'après le troisième mois de la gestation, il y a une augmentation importante de la quantité globale d'œstrogène excrété, après le 6^e mois, le coefficient d'augmentation mensuel est encore plus important, on peut alors atteindre la dernière semaine une excrétion de 22 mg. d'œstriol et 3 mg. d'œstrone. 48 heures après l'accouchement, les hormones ont repris leur taux initial.

Smith et Smith (1940) séparent les 3 œstrogènes (libres + combinés) après hydrolyse et dosent chacune des fractions par la méthode biologique. On remarque sur le tableau ci-dessous la prédominance de l'œstriol tout au long de la grossesse, la faible quantité d'œstradiol qui s'élève brusquement pendant la dernière semaine de la gestation, alors que la quantité d'œstriol décroît et que l'œstrone a totalement disparu.

Age de la grossesse en semaines	Œstrone en γ	Œstradiol en γ	Œstriol en γ
12	33	22	500
16	166	50	2.000
21	445	66	4.000
25 1/2	465	100	7.500
27	267	66	10.000
29	890	66	10.000
31	267	60	10.000
33	667	75	11.100
35	220	50	12.500
37	667	50	26.500
39	450	66	30.000
39 1/2	0	200	10.000

Ce tableau, exprimé en milligrammes dans le texte original, a été converti en γ pour faciliter les comparaisons.

Jaubert (1949), séparant la fraction œstrone-œstradiol de l'œstriol (méthode chromatographique), remarque que si la quantité d'œstriol est de beaucoup la forme la plus importante de l'élimination des œstrogènes pendant les 8 premiers mois, tout à fait à la fin de la grossesse, c'est la fraction phénolique faible qui prédomine.

Bachman et Pettit (1941) comparent les résultats qu'ils obtiennent en utilisant la méthode de Kober après séparation chimique des fractions OD et T avec ceux de Smith et Smith par la

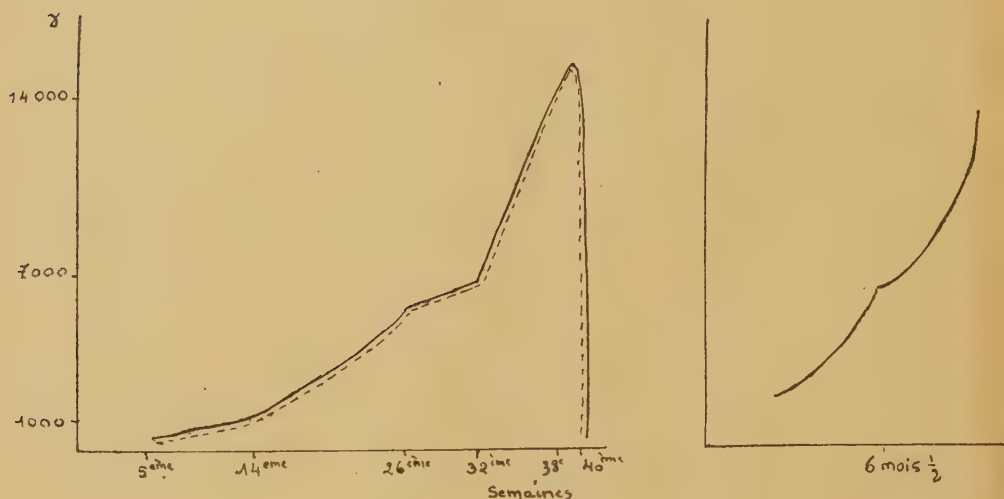
méthode biologique (voir tableau ci-dessus) et constatent qu'ils obtiennent des résultats du même ordre de grandeur.

Pour Mayer (1951), utilisant la réaction de Kober, le tracé d'élimination de l'œstrone s'élève progressivement pour atteindre 1.000 γ à la douzième semaine, 3.000 à la 20^e semaine, et ce taux augmente encore jusqu'à la 39^e semaine. L'auteur compare ces résultats à ceux publiés par Jayle (1950). Ceux-ci concordent jusqu'à la 20^e semaine, mais le taux le plus élevé noté par Mayer est de 5.200 γ par 24 heures. Alors que Jayle, à 8 mois 1/2 de grossesse, note un maximum à 11.000 γ . Mayer trouve aussi des variations individuelles importantes, mais la constance absolue de la chute des œstrogènes dès l'accouchement.

Jayle (1953) effectue une double mesure des « phénolstéroïdes » et de la « folliculine », ceux-ci intéressant les mêmes métabolismes dont ils représentent deux déterminations légèrement différentes qui se contrôlent mutuellement. Jayle donne les tracés moyens des phénolstéroïdes et de la folliculine en fonction de l'âge de la grossesse. Les tracés sont parallèles et dessinent les mêmes accidents, mais au début de la grossesse, c'est le dosage de la « folliculine » qui a le plus de valeur. Jayle considère 4 segments nettement distincts dans cette courbe :

- De la 5^e à la 14^e semaine (après les dernières règles) :
élévation graduelle, mais faible.
- De la 15^e à la 26^e semaine :
élévation plus importante environ de 690 γ par semaine.
- de la 26^e à la 32^e semaine :
les points oscillent autour d'un plateau horizontal.
- de la 32^e à la 38^e semaine :
relèvement très important du tracé, qui atteint son maximum dès la 38^e semaine.

Jayle reproduit à titre de comparaison une courbe obtenue en 1945 et fait remarquer que l'on trouve sur ce tracé les 4 segments caractéristiques.



II. — Interprétation des résultats des divers auteurs.

Nous constatons une concordance grossière des résultats des divers auteurs, soit :

— une augmentation faible du taux des œstrogènes à partir du 3^e mois ;

— une augmentation plus rapide de ce taux vers le 6^e mois jusqu'à la fin de la grossesse ;

— une diminution très rapide dans les 48 heures qui suivent le jour de l'accouchement, avec retour au taux normal d'œstrogène trouvé pendant un cycle menstruel.

Cette courbe générale du taux des œstrogènes est retrouvée quelle que soit la méthode utilisée, biologique ou chimique, l'expression du résultat, soit unité biologique convertie en γ d'œstrone ou γ de la fraction OD ou de la fraction T, fractions dosées par la méthode de Kober, ou encore phénol-stéroïdes totaux de Jayle.

Par contre, les valeurs numériques, prises en absolu, sont très variables :

- 1° avec les individus testés ;
- 2° avec les méthodes.

1° Variations individuelles des données numériques.

Pour une même méthode, les valeurs minima obtenues par de nombreux dosages se groupent de façon relativement cohérente si on élimine strictement tout cas pathologique. Les valeurs maxima, par contre, peuvent s'élever considérablement chez certaines femmes présentant par ailleurs une gestation absolument normale et Jayle a lui-même signalé ce fait. Ces valeurs plus élevées se présentent surtout dans les trois derniers mois de la grossesse.

2° Variations des résultats numériques selon la méthode utilisée.

On les trouve parfois dans un rapport qui peut être de $1/2$, mais ceci surtout dans les derniers mois de la gestation. L'importance de cette variabilité dans les résultats s'efface cependant si l'on considère l'augmentation considérable du pouvoir œstro-gène des urines, qui atteint aux 8^e et 9^e mois des taux 150 et 200 fois ce qu'ils sont au début de la grossesse, si l'on considère aussi les variations individuelles, qui donnent des valeurs pouvant atteindre une fois $1/2$ le taux moyen.

CHAPITRE IV

TECHNIQUE DE DOSAGE UTILISEE AU LABORATOIRE

La technique choisie à la clinique obstétricale devait tenir compte des conditions de travail du laboratoire appelé à réaliser un nombre très élevé d'analyses, avec des moyens de matériel et de personnel limités. Il fallait donc que ce fut une méthode de routine, de réalisation suffisamment simple et rapide, sans appareillage trop onéreux.

Il n'était pas question d'adopter une méthode biologique, dont les résultats sont assez fidèles, mais qui nécessite malheureusement des élevages importants et des manipulations très longues. Il était séduisant d'envisager une méthode fluorimétrique dont plusieurs modalités intéressantes ont été proposées ces dernières années (Finkelstein, Jailer, Engel, Heusghem, etc...), les conditions techniques de la fluorescence ont été bien étudiées, mais il n'est pas encore possible d'éviter un double écueil :

D'une part, il est bien établi aujourd'hui que les extraits urinaires présentent une fluorescence totale, dont une partie seulement doit être imputée aux œstrogènes.

D'autre part, ces extraits exercent vis-à-vis de la fluorescence spécifique des œstrogènes un pouvoir inhibiteur variable avec chaque cas, qui en masque une partie. Il en résulte une part d'inconnu variable, dont les divers artifices techniques proposés, malgré une augmentation considérable de la durée des manipulations, n'ont apporté que des solutions incomplètes.

Dans ces conditions, l'achat d'un fluorimètre, appareil indispensable pour ce genre de technique, fort onéreux, nous a paru d'un intérêt encore discutable, et nous sommes demeurés fidèles à la réaction classique de Kober, moins sensible certes, mais qui

a l'avantage de ne pas subir d'effet inhibiteur de la part des extraits urinaires.

L'utilisation, par ailleurs, de la modification proposée par Jayle améliore sensiblement la spécificité de la réaction pratiquée sur des extraits imparfaitement purifiés.

*
**

Prise d'essai d'urines (recueillies sur cyanure de mercure) :

1/5 aux 1^{er} et 2^e mois ;

1/10 aux 3^e et 4^e mois ;

1/20 aux 5^e et 6^e mois ;

1/40 ensuite.

HYDROLYSE.

Après addition de 15 % d'HCl concentré, chauffer pendant 30 mn à feu nu à l'ébullition à reflux.

DÉFÉCATION.

Seulement du 1^{er} au 4^e mois inclus :

Ajouter 1 gr. d'acétate de zinc pour 50 cc. d'hydrolysât. Après dissolution, alcaliniser avec de la NaOH jusqu'à pH = 8. Centrifuger. Conserver le liquide surnageant.

EXTRACTION.

Extraire le culot avec 2 fois 10 cc. d'éther sans peroxyde, par agitation pendant quelques minutes avec un agitateur de verre. Centrifuger. Conserver l'éther.

Extraire l'hydrolysât déféqué par 3 fois 30 cc. d'éther anhydre et sans peroxyde, sur un agitateur magnétique, pendant 15 minutes la première fois et 10 minutes les 2 autres fois.

L'éther est ensuite lavé avec 2 fois 15 cc. de CO_3N_2 à 5 %, la solution carbonatée étant elle-même réextraite par deux fois 12 cc. d'éther.

PASSAGE SUR LA NaOH N.

Par agitation sur l'agitateur magnétique des éthers réunis avec 20, puis 15 + 15 cc. de NaOH N.

REPRISE PAR LE CHLOROFORME.

Les NaOH réunies sont reprises par 3 fois 6 cc. de chloroforme, qui est ensuite lavé avec :

- 10 cc. de CO_3Na_2 à 5 %,
- 10 cc. de SO_4H_2 ,
- enfin, 10 cc. d'eau distillée.

Ce chloroforme renferme la fraction œstrone-œstradiol (ou fraction phénolique faible).

REPRISE PAR L'ÉTHÉR.

La soude restant après extraction par le chloroforme est reprise après acidification à pH 1 avec HCl par 3 fois 100 cc. d'éther.

Cet éther est lavé avec :

- 15 cc. de CO_3Na_2 à 9 %.
- 15 cc. de SO_4H_2 à 1/5
- et 15 cc. d'eau distillée.

Il contient la fraction œstriol (ou fraction phénolique forte).

RÉACTION COLORÉE.

a) Préparation du réactif de Kober :

Le phénol, purissime (Merck), est fondu au bain-marie à 60°. Il est alors introduit progressivement dans l'acide sulfurique (pur RP) maintenu à basse température, à raison de 3,6 parties de phénol pour 5,6 parties de SO_4H_2 . On dilue ensuite le mélange avec son volume d'acide SO_4H_2 pur. Le réactif ainsi obtenu doit être presque incolore. Il peut être conservé plusieurs semaines dans un flacon bouché émeri, en verre brun, à la glacière.

b) Dosage :

2 parties aliquotes, de grandeurs différentes, choisies suivant la richesse supposée en œstrogène, et au besoin après un essai préalable sur un seul tube, pour chaque fraction (OD et T) sont évaporées à sec au bain-marie, dans des tubes à hémolyse longs et minces.

On ajoute ensuite à tous les tubes 0,4 cc. du réactif de Kober,

et après les avoir bouchés avec des bouchons de vinylite, on les plonge tous ensemble dans un bain-marie bouillant pendant 10 minutes.

Chaque tube est agité séparément une minute après avoir été plongé dans le bain, puis une nouvelle fois, quelques minutes plus tard.

Le panier portant les tubes est plongé, au sortir du bain-marie, dans la glace pilée.

A partir de ce moment, chaque tube doit être traité *séparément*.

Après addition de 0,35 cc. d'eau distillée, on plonge le tube 1 minute dans un bain-marie bouillant, puis 30 secondes dans de la glace finement pilée en agitant. On ajoute alors 1,25 cc. d'un mélange glacé, à volume égal d'eau distillée et d'acétone, et après avoir bien mélangé, on effectue la mesure exactement une minute après l'addition d'acétone.

La mesure est prise à 510 m μ dans un spectrophotomètre, ou à défaut, dans un électrophotomètre possédant un filtre vert sélectif, au moyen d'une cuve carrée de 1 cm. de côté (ce qui permet de faire la mesure photométrique sur moins de 2 cc. du mélange initial).

Les tubes, bien bouchés, sont maintenus à l'obscurité pendant 18 à 24 heures jusqu'à disparition de la coloration rose. On effectue alors une seconde mesure colorimétrique. Les impuretés colorées n'ayant subi qu'une décoloration minime, la différence entre les deux mesures est fonction seulement de la quantité d'œstrogène présente dans chaque tube. Cette différence est traduite en γ d'œstrone d'après la courbe d'étalonnage de l'appareil, aussi bien pour la fraction T que pour la fraction OD.

c) Etalonnage :

Faute d'œstriol en quantité suffisante pour réaliser l'étalonnage périodique de l'appareil, cet étalonnage a été fait uniquement avec une solution alcoolique d'œstrone pur pour des doses allant de 2 γ à 15 γ , et les résultats de la fraction T évaluée sur le même courbe, se trouvent donc exprimés en équivalent d'œstrone eux aussi.

CHAPITRE V

RESULTATS OBTENUS A LA CLINIQUE OBSTETRICALE

Un nombre important de dosages des œstrogènes a été effectué au laboratoire de la Clinique depuis 1952. Une thèse statistique du Docteur Revol en 1954 avait répertorié les dosages pratiqués jusqu'au 1^{er} octobre 1953. Les dosages pratiqués du 1^{er} octobre 1953 au 1^{er} octobre 1954 ont été publiés par M. Van Stratten.

Nous avons choisi parmi ces nombreux dosages un certain nombre d'observations de femmes présentant, cliniquement, une grossesse normale. Nous avons groupé ces 151 dosages selon l'âge de la grossesse dans le tableau ci-dessous et nous avons calculé la moyenne mensuelle d'excrétion du 2^e mois à la fin de la grossesse. De plus, deux dosages effectués la veille de l'accouchement et 5 dosages sur les urines prélevées dans les deux jours qui suivent l'accouchement sont donnés à titre d'exemple. (Voir tableau ci-dessous).

D'après les résultats de ce tableau, nous établissons la courbe moyenne d'élimination des œstrogènes, fraction OD et fraction T. (Voir courbe I).

D'autre part, dix femmes enceintes ont pu être suivies très régulièrement pendant toute la grossesse et les suites de couche, tant au point de vue de l'élimination des œstrogènes que de l'élimination du pregnandiol et des corticoïdes. La courbe moyenne de l'élimination de ces diverses hormones a été publiée en juin 1954 à la Société obstétricale de Lyon par MM. Pigeaud, Burthiault, Bethoux, Charrière. Nous la reproduisons ici (Courbe II).

INTERPRÉTATION DE CES RÉSULTATS

Il est intéressant de noter que nous avons retrouvé, soit en effectuant la moyenne d'un nombre important de dosages, soit en suivant l'élimination hormonale de 10 femmes, 2 courbes reproduisant à peu près les mêmes accidents :

La courbe d'élimination de la fraction OD s'élève graduellement, mais de façon relativement faible, présentant un maximum vers le 7^e mois (courbe I) ou vers le sixième mois (courbe II). Ce maximum est en moyenne compris entre 1.000 γ et 1.600 γ , mais il atteint pour certaines femmes une valeur de 2.000 γ . Ensuite et jusqu'à la fin de la grossesse, le taux d'élimination s'abaisse de façon très progressive pour être encore de l'ordre de 700 à 800 γ au 9^e mois. Il diminue brutalement après l'accouchement et se trouve inférieur à 100 γ 48 heures après celui-ci.

La courbe d'élimination de la fraction T s'élève de façon progressive et modérée jusqu'au 4^e mois, puis le taux d'élimination s'accroît notablement pendant 2 à 3 mois, reste presque stationnaire (courbe I) ou décroît de façon plus marquée (courbe II) pour s'élever rapidement au cours du 9^e mois et atteindre de l'ordre de 10.000 γ en moyenne, mais parfois 15.000 γ et même plus chez certaines femmes. 48 heures après l'accouchement, ce taux a repris une valeur de 100 à 200 γ .

Si nous comparons les résultats que nous avons obtenus (fraction OD + fraction T) avec ceux obtenus par Jayle (1953), phénols stéroïdes totaux, nous notons les mêmes caractéristiques. Les courbes présentent 4 segments, un accroissement du taux des œstrogènes de plus en plus rapide du début à la fin de la grossesse avec une anomalie, stabilité passagère ou légère diminution du taux d'élimination avant l'accroissement très important des dernières semaines. Mais cette rupture de continuité de la courbe qui se situe pour Jayle vers 6 mois et demi, se situe dans la courbe I entre le 7^e et le 8^e mois et dans la courbe II entre le 6^e et le 8^e mois. Cette différence entre nos résultats et ceux obtenus par Jayle est donc peu importante et nos résultats sont comparables tant au point de vue de l'ordre de grandeur de ceux-ci que de l'évolution du taux d'élimination hormonale au cours de la grossesse. La différence résulte de la différence des techniques et les chiffres supérieurs

de Jayle représentent probablement un certain nombre de corps à réaction Kober positive, mais non œstrogène. La technique utilisée au laboratoire de la clinique obstétricale apporte cependant un renseignement supplémentaire en dissociant le taux d'élimination de l'œstriol (fraction T) du taux d'élimination des hormones proprement dites (fraction OD), et si l'on se réfère à certains travaux étrangers, peut-être cette double appréciation rendra-t-elle des services au cours des modifications de l'élimination hormonale dans certains syndromes pathologiques de la gestation.

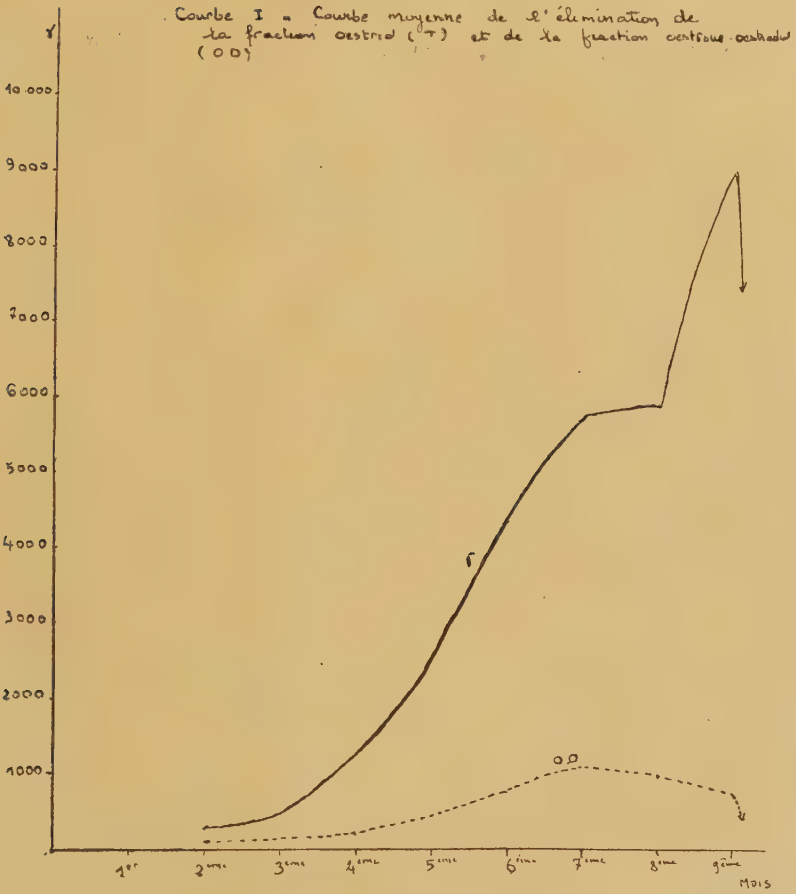


Nous espérons que notre travail, qui fait suite à ceux relatifs au dosage du pregnandiol et des corticoïdes dans la grossesse normale, permettra d'étudier avec plus de précision les troubles hormonaux qui peuvent se rencontrer dans certains cas de grossesse pathologique.

2 ^e mois		3 ^e mois		4 ^e mois		5 ^e mois		6 ^e mois		7 ^e mois		8 ^e mois		9 ^e mois		24 heures avant accouchem.
OD	T	OD	T	OD	T	OD	T	OD	T	OD	T	OD	T	OD	T	
55	140	100	180	220	1160	280	1160	600	5500	400	4375	720	3500	720	1300	OD
60	90	140	625	280	525	240	1000	240	2620	440	8000	760	4100	320	5000	
75	62	250	270	120	525	280	1750	320	2500	200	5800	1120	4100	640	4900	640
85	100	180	330	100	760	320	1510	445	1075	560	4000	720	5200	1850	22500	480
40	80	120	310	180	775	680	2660	685	6875	800	4830	1150	7400	800	9900	
75	175	120	375	140	775	320	1200	280	1270	2400	5600	2580	5800	830	9875	T
40	100	130	590	360	620	240	1560	210	2375	1000	4800	1450	5300	1200	3700	
50	160	280	330	130	1600	360	1600	440	3000	2100	5400	1250	4200	480	8160	
245	235	120	630	130	950	320	1620	1000	4600	1000	4000	640	2000	2050	15700	
60	230	70	700	380	1375	640	2620	640	4000	480	625	850	11800	500	3800	5660
50	65					640	5080	480	4350	800	7830	1100	4000	550	13300	8000
75	125					450	2910	600	7660	880	6125	1300	4200			
						625	2460	560	6450	720	8960	1100	4300			
						700	3000	1100	6000	1000	4600	750	4500			
						540	1750	520	5750	440	6600	320	4250			
								400	4830	1000	4800	640	2875			
								440	2900	2000	8000	585	6600			
								340	2435	1250	3000	800	11000			
								1200	6000	360	5660	670	9700			
										720	10500	1300	7000			
										800	3200	700	3600			
										960	4200	750	4400			
										1440	6000	650	5650			
										1300	6000	1120	5330			
										2150	6800	640	6750			
										1600	6200	1600	7200			
										1400	5400	1100	4000			
												1160	3660			
												480	6390			
												360	4430			
												640	3000			
												1000	4600			
												480	3600			
												900	12900			
												1325	5300			
												1630	4900			
Moyenne		Moyenne		Moyenne		Moyenne		Moyenne		Moyenne		Moyenne		Moyenne		48 heures après accouchem.
75	130	150	430	204	906	442	2125	552	4231	1040	5601	953	5487	899	8921	

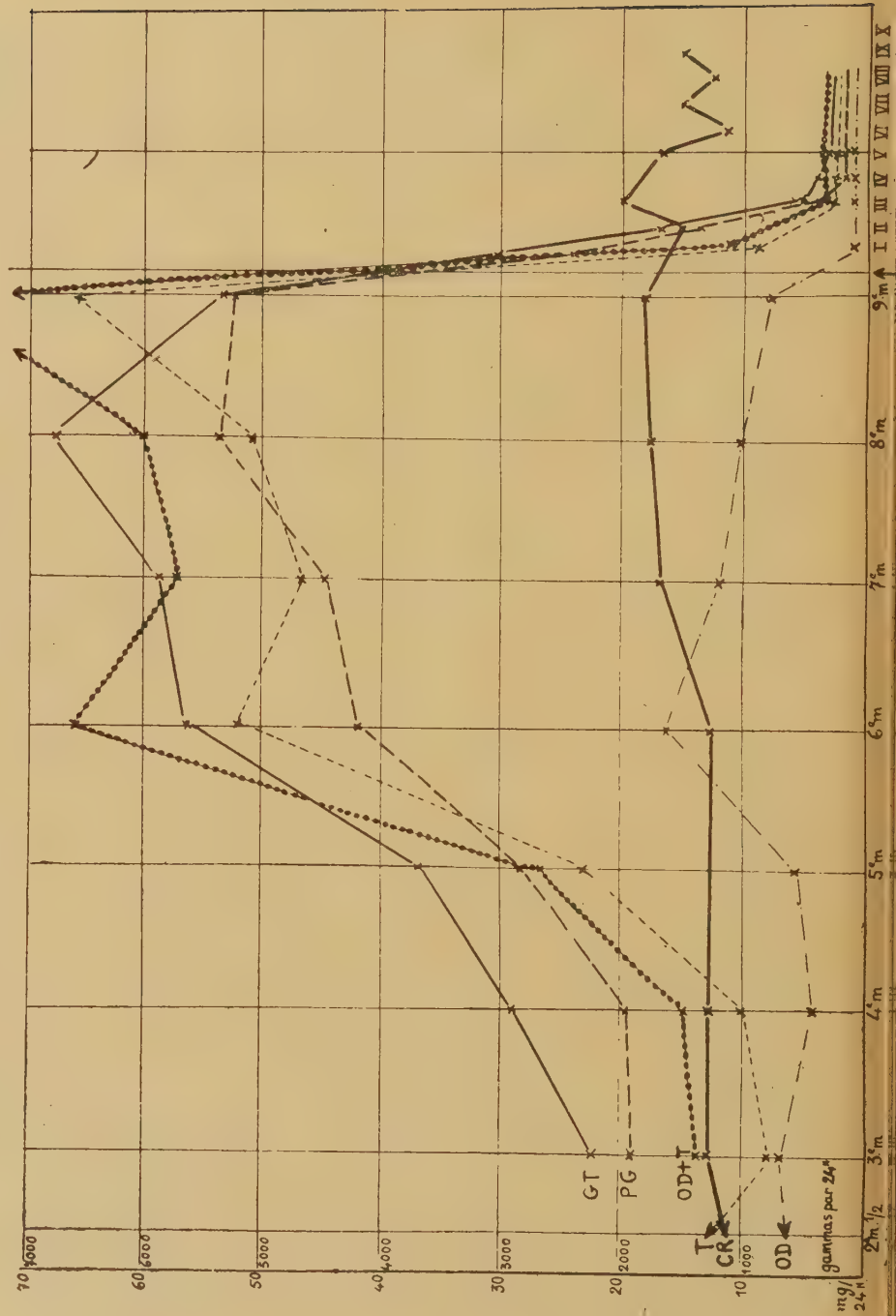
COURBE MOYENNE D'ÉLIMINATION DE LA FRACTION ŒSTRIOL (T)
ET DE LA FRACTION ŒSTRONE-ŒSTRADIOL (OD)

COURBE I



COURBE II

ÉLIMINATION HORMONALE DANS LA GROSSESSE NORMALE ET LES SUITES DE COUCHES
PRÉGNANDIOL ET GLYCURONIDATES TOTAUX ŒSTROGENES (FRACTION OD ET T), CORTICOÏDES



CONCLUSIONS

I. — Faisant suite à la thèse de Charre (1950), qui étudie l'élimination urinaire du prénandiol et à la thèse de Charrière (1954), traitant de l'élimination des corticoïdes au cours de la grossesse normale, notre thèse est consacrée à l'étude de l'élimination urinaire des œstrogènes.

II. — La technique utilisée mise au point par M. Bethoux est une technique colorimétrique. Elle présente l'avantage, outre sa relative rapidité et sa simplicité, de doser séparément la fraction OD (œstrone, œstradiol) et la fraction T (œstriol).

III. — Les moyennes que nous donnons résultent de 148 dosages pratiqués au cours de grossesses cliniquement normales.

IV. — Les courbes d'élimination hormonale des œstrogènes que nous avons obtenues sont sensiblement superposables à celles publiées par les différents auteurs, seul peut varier le chiffre en lui-même, car celui-ci dépend en grande partie de la technique de dosage utilisée.

V. — Au cours de la grossesse normale, la fraction OD (œstrone-œstradiol) augmente de façon relativement modérée et l'élimination atteint un maximum deux mois avant terme (1.040 γ) ; la courbe redescend ensuite légèrement et le taux d'élimination est de 800 γ au voisinage du terme.

La fraction T (œstriol) augmente dans des proportions beaucoup plus importantes. La courbe d'élimination, légèrement irrégulière, reproduit presque fidèlement les 4 segments de la courbe d'élimination des phénols stéroïdes totaux établis par Jayle ; on y remarque une élévation graduelle mais faible pendant les quatre premiers mois, une élévation plus impor-

tante du quatrième au septième mois, une stabilité au huitième mois, enfin un relèvement très important du taux excrété et ceci jusqu'à la fin de la grossesse. L'élimination quotidienne de l'œstriol à la veille de l'accouchement atteint en moyenne 9.000 γ par 24 heures.

Vu :

Le Doyen,
HERMANN.

Vu :

Le Président de la Thèse,
H. PIGEAUD.

Vu et permis d'imprimer :

Lyon, le 29 Juin 1955.

A. ALLIX.

BIBLIOGRAPHIE

- ALLEN E. — *Am. J. Anat.*, 30, 227, 1922.
- ALLEN et DOISY. — *J. Am. Med. Ass.*, 81, 219, 1923.
- ALLEN E. — *J.A.M.A.*, 116, 405, 1941.
- ASCHEIM et ZONDECK. — *Klin. Woch.*, 1404, 1928.
- BACHMAN. — *J. Biol. Chem.*, 131, 455, 1939.
- BACHMAN et PETTIT. — *J. Biol. Chem.*, 138, 689, 1941.
- BATES et COHEN. — *Federation Proceedings*, 6, 236, 1947.
- BATES et COHEN. — *Endocrinology*, 47, 166, 1950.
- BITMAN et SYKES. — *Science*, 117, 356, 1953.
- BLOCH. — *J. Biol. Chem.*, 155, 661, 1944.
- BORCHARD, DINQUEMANSE et LAQUEUR. — *Naturwissenschaften*, 22, 190, 1934.
- BOSCOTT. — *Nature London*, 162, 577, 1948.
- BOSCOTT. — *Nature London*, 164, 140, 1949.
- BOSCOTT. — *Biochem.*, 48, 47, 1951.
- BOUTE. — *Ann. d'Endocr. Fr.*, 14, 518, 1953.
- BRAUNSBURG. — *J. Endocrin.*, 8, 11, 1952.
- BURTON, ZAFFARONI, KEUTMAN. — *J. Clin. Endocr.*, 8, 618, 1948.
- BUSCH. — *Nature*, 166, 445, 1950.
- BURTHIAULT. — *Rev. Fr. Gyn. et Obst.*, 48, 206, 1953.
- BUTENAND. — *Nature*, 45, 879, 1929.
- CALLOW. — *Biochem. J.*, 30, 907, 1936.
- CARO. — Thèse de Pharmacie de Paris, 1947.
- CAROL et MOLITOR. — *J. Am. Pharm.*, 39, 625, 1950.
- CARTLAND, MEYER, MILLER et RUTZ. — *J. Biol. Chem.*, 109, 313, 1935.
- COHEN et MARRIAN. — *Biochem. J.*, 28, 1603, 1934.
- COHEN et MARRIAN, WATSON. — *The Lancet*, 1, 675, 1935.
- COHEN et MARRIAN. — *Nature*, 135, 1072, 1935.
- COHEN et MARRIAN. — *Biochem. J.*, 29, 1577, 1935.
- COHEN, MARRIAN et ODELL. — *Biochem. J.*, 30, 2250, 1936.
- COHEN et BATES. — *Endocrinology, U.S.A.*, 45, 86, 1949.
- COLLIP, BROWN et THOMSON. — *J. Biol. Chem.*, 17, 97, 1932.
- DHERE. LASZT. — *C.R.* 224, 691, 1947.
- DOISY, VELER, THAYER. — *Abstr. Physiol. Cong. in Am. J. Phys.*, 90, 329, 1929.
- DOISY et CURTIS. — *J. Biol. Chem.*, 91, 647, 1931.
- EICHENBERGER. — *Gynecologia*, 22, 128, 1949.

- ENGEL, SLAUWHITE, CARTHER et NATHANSON. — *J. Biol. Chem.*, 185, 255, 1950.
- ENGEL, SLAUWHITE. — *J. Biol. Chem.*, 191, 621, 1951.
- FINKELSTEIN. — *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 69, 181, 1948.
- FINKELSTEIN. — *Nature*, 168, 830, 1951.
- FISCHMAN. — *J. Biol. Chem.*, 131, 225, 1939.
- FRIEDGOOD, GARST. — *J. Biol. Chem.*, 174, 523, 1948.
- GARST, NYC, MARON, FREEDGOOD. — *J. Biol. Chem.*, 186, 119, 1950.
- GHILAIN, BOUTE. — *Ann. Endocrinol. Fr.*, 14, 609, 1953.
- GIRARD. — *J. Pharm. Chim.*, 17, 61, 1933.
- GOLDZIEHER. — *Endocrinology*, 53, 527, 1953.
- GRANT et MARRIAN. — *Biochem. J.*, 47, 1, 1950.
- HEARD et SUFFRAN. — *Recent Progress in Hormon Research*, 4, 43, 1949.
- HEFTMAN. — *Science*, 111, 517, 1950.
- HEFTMAN. — *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 851, 1951.
- HEINTZBERGER. — *Academisch Proefschrift Amsterdam*, 1942.
- HELLER. — *Endocrinology*, 26, 619, 1940.
- HENRY, THÉVENET et JARRIDGE. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 34, 897, 1952.
- HEUSGHEM. — *J. Pharm. Belg.*, 499, 1952.
- JALLER. — *Endocrinology*, 41, 198, 1947.
- JAYLE, CRÉPY, JUDAS. — *C.R. Soc. Biol.*, 25, 301, 1943.
- JAYLE, CRÉPY, JUDAS et VAUDIL. — *C.R. Soc. Biol.*, 28, 363, 1946.
- JAYLE. — *Exposés de biochimie Médicale*, 8, 175, 1948.
- JAYLE. — *Gyn. et Obst.*, 49, 336, 1950.
- JAYLE, CRÉPY, GUEGEN, VEYRIN, FORRER. — *Gyn. et Obst. Fr.*, 52, 329, 1953.
- KOBER S. — *Biochem. Z.*, 239, 209, 1931.
- KOBER. — *Abderhalden's Handb. Biol. Mith. Abd.*, 313, 936, 1936.
- LE CLERC A.-M. — *Thèse Ing. Doct.*, Paris, 1953.
- LIPSCHUTZ et POCH. — *Compt. Rend. Soc. de biologie*, 111, 856, 1932.
- MacCORQUODALE, THAYER et DOISY. — *J. Biol. Chem.*, 45, 435, 1936.
- MARRIAN G.F. — *Biochem. J.*, 24, 435, 1930.
- MARRIAN G.F. — *Physiol. Rev.*, 13, 185, 1933.
- MARRIAN et BAULD. — *Acta Endocrinol. Dan.*, 7, 240, 1951.
- MATHER. — *Proc. Biol. Chem. in J. Biol. Chem.*, 133, 63, 1940.
- MAYER. — *C.R. Soc. Biol.*, 140, 673, 1946.
- MAYER. — *Bruxelles Médical*, 32, 1671, 1951.
- ODELL, SKILL, MARRIAN. — *J. Pharm.*, 60, 420, 1937.
- PEARLMAN, PEARLMAN et RAKOFF. — *Am. J. Obst. et Gyn.*, 66, 373, 1953.
- PINCUS, WEHLER, YOUNG, ZAHL. — *J. Biol. Chem.*, 116, 253, 1936.
- PINCUS et ZAHL. — *J. Gen. Phys.*, 20, 879, 1937.
- ROSENMOND. — *Helv. Physiol. Acta*, 6, 349, 1948.
- SALTER. — *J. Clin. Endocr.*, 8, 295, 1948.

- SMITH et SMITH. — *Am. J. Physiol.*, 112, 340, 1935.
SMITH et SMITH. — *Proc. Soc. Expt. Biol. et Med.*, 36, 460, 1937.
SMITH. HUFFMAN, SMITH. THAYER, MacCORQUODALE, DOISY. — *J. Biol. Chem.*, 130, 431, 1939.
SMITH, SMITH et SCHILLER. — *Endocr.*, 25, 509, 1939.
SMITH et SMITH. — *Am. J. Obst. et Gyn.*, 39, 405, 1940.
SMITH et SMITH. — *Proc. Soc. Expt. Biol. et Med.*, 40, 104, 1940.
SMITH et SMITH. — *Endocrinology*, 28, 740, 1941.
SMITH, SMITH et SCHILLER. — *J. Chim. Endocrinology*, 1, 461, 1941.
SMITH et SMITH. — *Endocrinology*, 35, 146, 1944.
STERN et SWYER. — *Nature G.B.*, 169, 796, 1952.
STEWENSON et MARRIAN. — *Biochem. J.*, 41, 507, 1947.
STIMMEL B.F. — *J. Biol. Chem.*, 153, 327, 1944.
STIMMEL B.F. — *J. Biol. Chem.*, 162, 98, 1946.
STIMMEL B.F. — *J. Biol. Chem.*, 165, 73, 1946.
STIMMEL B.F. — *J. Biol. Chem.*, 178, 217, 1949.
STIMMEL B.F. et STEALEY. — *J. Clin. Endocrinol.*, 12, 489, 1952.
SWYER et BRAUNSBURG. — *J. Endocrinol.*, 7, 60, 1951.
SZEGO et SAMUELS. — *Proc. Soc. Biol.*, 43, 263, 1940.
SZEGO et SAMUELS. — *J. Biol. Chem.*, 151, 587, 1943.
TALBOT. — *J. Biol. Chem.*, 134, 319, 1940.
VAN BRUGGEN. — *J. Lab. et Clin. Med.*, 33, 207, 1948.
VENNING, EVELYN, HARKNESS et BROWN. — *J. Biol. Chem.*, 120, 225, 1937.
VERDOLLIN. — *Thèse Médecine de Marseille*, 1935.
WOLFE, HERSHBERG, FISHER. — *J. Biol. Chem.*, 136, 653, 1940.
ZONDECK et ASCHEIM. — *Klin. Wehn Schr.*, 7, 821, 1928.
ZONDECK et ASCHEIM. — *Klin. Wehn Schr.*, 9, 2285, 1930.
ZONDECK. — *Nature*, 133, 209, 1934.
ZONDECK. — *Skand. A. Physiol.*, 70, 133, 1934.

TABLE DES MATIERES

Introduction	9
<i>Chapitre premier.</i> — Généralités sur les hormones œstrogènes.	11
I. — Découverte	11
II. — Propriétés	11
III. — Métabolisme	13
<i>Chapitre II.</i> — Méthodes de dosage des œstrogènes	19
Dosage par les méthodes biologiques	29
Dosage par les méthodes colorimétriques. — La réaction de Kober	31
Dosage par les méthodes fluorimétriques	37
Les nouvelles méthodes :	42
— Chromatographie de partage	43
— Chromatographie d'adsorption	46
— Spectrophotométrie ultraviolette	48
— Spectrophotométrie infrarouge	49
— Polarographie	50
<i>Chapitre III.</i> — Résultats fournis par les différentes méthodes de dosage au cours de la grossesse normale	51
<i>Chapitre IV.</i> — Technique de dosage utilisée au laboratoire . .	59
<i>Chapitre V.</i> — Résultats obtenus à la clinique obstétricale	63
Conclusions	69
Bibliographie	71

